

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Papel del gen Polycomb
Bmi1 en la biología de las
células madre cardíacas
residentes en mamíferos**

TESIS DOCTORAL

ÍÑIGO VALIENTE ALANDÍ
MADRID, 2014

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica

Papel del gen Polycomb Bmi1 en la biología de las células madre cardíacas residentes en mamíferos

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Íñigo
Valiente Alandí**, licenciado en Biología, para optar
al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de
Madrid.

Director de Tesis:

Antonio Bernad Miana

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares

Instituto de Salud Carlos III

A mis admirables padres

*“Las grandes almas tienen
voluntades; las almas
débiles sólo tienen deseos”
Lao Tse*

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El trabajo titulado “Papel del gen Polycomb Bmi1 en la biología de las células madre cardíacas residentes (eCSC) en mamíferos” ha sido realizado por D Iñigo Valiente Alandí bajo mi dirección, en el Departamento de Cardiología Regenerativa, de la Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

Las enfermedades del corazón, y principalmente, el infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca, son las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en el primer mundo, y hoy en día el único tratamiento disponible para éstas es el trasplante del órgano, posibilidad cada vez más infrecuente. El trasplante de células se ha convertido en una nueva opción terapéutica y se han llevado a cabo aproximaciones de terapia celular utilizando diferentes poblaciones de células madre en humanos, mostrando mejoras modestas. Entre estas poblaciones evaluadas las células madre cardíacas (CSC) representan una buena opción, debido a su potencial de diferenciación específica hacia el linaje cardíaco y que han arrojado resultados prometedores .

A pesar de los numerosos trabajos que han identificado diferentes poblaciones de células progenitoras cardíacas existe una gran confusión y controversia acerca de qué población recogería más fehacientemente las propiedades de la célula madre cardíaca. Para conseguir avanzar es necesario realizar análisis de trazado de linaje con marcadores que recapitulen la esencia de las células madre, y poder estudiar así su potencialidad *in vivo*, bajo condiciones de homeostasis y tras daño cardíaco. En este trabajo se ha empleado Bmi1 como marcador de referencia, ya que representa un factor de transcripción clave, no sólo para la definición de las células madre hematopoyéticas y neurales adultas, sino también para una amplia variedad de compartimentos de células madre en distintos órganos.

El marcaje celular inducible ha permitido describir la existencia de células residentes cardíacas (Bmi1+) que se visualizan y aíslan en base a la expresión de YFP. Estas células Bmi1+ se encuentran distribuidas por toda la estructura cardíaca, pero formando *clusters* en dos localizaciones fundamentales: intramiocárdica y asociadas a vasos. Las células Bmi1+ aisladas muestran una expresión preferente de genes asociados con *stemness* y auto-mantenimiento, y poseen capacidad de diferenciación multipotente, tanto *in vitro* como *in vivo*, dando lugar a cardiomiocitos maduros que son reconocidos por expresar YFP. El seguimiento de la población Bmi1+ marcada a lo largo de toda la vida del animal (2 -24 meses) ha permitido demostrar que dicha población mantiene unos niveles casi constantes y que por tanto goza de capacidad de auto-mantenimiento. Finalmente, estudios de respuesta a daño agudo (IAM) han permitido demostrar que la representación de cardiomiocitos YFP+ se incrementa significativamente respecto a la homeostasis. Sin embargo, en la ventana de animales neonatos, las células Bmi1+ no parecen contribuir de forma importante.

En resumen, el trabajo ha permitido definir, aislar y caracterizar una población de células madre cardíacas residentes murinas, con capacidad de auto-mantenimiento a largo plazo. Los datos obtenidos han sido debidamente controlados, contrastados y son científicamente consistentes, habiendo sido además parcialmente presentados en congresos científicos. Por todo ello, considero que el trabajo recogido en la memoria posee la calidad científica y originalidad requeridas para ser defendido como Tesis Doctoral para la obtención del Grado de Doctor.

Madrid a 10 de Marzo de 2014

El director de la Tesis Doctoral

Fdo. Dr. Antonio Bernad

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, con su ayuda, han colaborado en la realización de este trabajo y me han ayudado a crecer profesionalmente. Quiero agradecer especialmente a mi director de tesis, Antonio Bernad, por la oportunidad de hacer la tesis en su laboratorio y por haberme permitido contribuir de forma activa en este proyecto brindándome la libertad para decidir.

Special thanks to Anne Ferguson-Smith for my stay with them in Cambridge. Those months were really uplifting for me.

Bea G.Gálvez, gracias por haber sido un sólido pilar en el que apoyarme y crecer en este camino. Ha sido un placer contar contigo.

Hace ya unos años, una profesora de técnicas microscópicas, con una mente maravillosa, despertó en mí el afán de conocimiento por la ciencia. Isabel Fariñas, eres un modelo a seguir. Gracias por despertarme y sustentarme en los momentos de flaqueza.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, ánimo y apoyo recibidos de mis padres, gracias a ellos soy quién soy y estoy aquí; sin ellos no lo habría conseguido. Nico gracias por tu infinita paciencia, no me imagino haber llegado al final del camino sin tu apoyo.

Especial reconocimiento merece Carmen Albo, para la que no tengo suficientes palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí. Gracias por enseñarme a amar la ciencia, disfrutarla cada segundo y luchar cada paso sin límite. Gracias por enseñarme a pensar y a no tener miedo ante lo desconocido. Este trabajo ha sido posible gracias a su dedicación, esfuerzo y rigor científico. Estar a tu lado, compartiendo penas y alguna que otra gloria, durante estos años ha sido un honor y un auténtico privilegio. Nuestro camino no ha hecho nada más que comenzar.

A todos ellos muchas gracias.

“I'm here to tell you that a champion is someone who has fallen off the horse a dozen times and gotten back on the horse a dozen times.

Successful people never give up”

Jean Driscoll

SUMARIO

El corazón de los mamíferos adultos se consideró durante mucho tiempo un órgano terminalmente diferenciado, sin capacidad para reemplazar los cardiomiocitos envejecidos o dañados. Este dogma se vio cuestionado por la creciente acumulación de evidencias científicas apoyando una baja, pero real, tasa de renovación endógena en el corazón adulto. Sin embargo, el origen de las nuevas células sigue sin estar totalmente esclarecido. Las investigaciones apuntan a la actividad de las células madre cardíacas (CSCs) como la principal fuente del reemplazamiento de los cardiomiocitos.

Las células madre adultas mantienen y reparan los tejidos de los organismos adultos, y la auto-renovación, la diferenciación y la prevención de la senescencia de las células madre adultas son aspectos fundamentales para la homeostasis del tejido. Las células progenitoras cardíacas se han definido principalmente por la expresión de marcadores de superficie tales como c-kit o Sca-1. Sin embargo, la diversidad en su caracterización ha dificultado su identificación inequívoca así como su definición molecular.

Bmi1, miembro del complejo PCR1 (*Polycomb repressive complex 1*) desempeña un papel crucial en la auto-renovación y mantenimiento de las células madre hematopoyéticas, neurales, intestinales, bronquioalveolares, de páncreas, de próstata, de pulmón y epiteliales, y más recientemente en la lengua y en incisivos de roedores.

Usando una estrategia de trazado de linaje para seguir la actividad del locus Bmi1, este trabajo muestra que el corazón adulto contiene una población no cardiomiocítica de células madre que expresan Bmi1 (Bmi1-CSCs). Esta población constituye una fracción de la población Sca-1+, muestra expresión de marcadores de multipotencia, y exhibe una capacidad para diferenciar a los principales linajes del corazón *in vitro*. El número de células Bmi1+ aumenta con el tiempo de vida de los animales, reforzando su capacidad de auto-renovación. Las células Bmi1+ se localizan en nichos y el trazado de su progenie tras 2 años indica que contribuyen a la baja tasa de renovación homeostática de los CM. Esta actividad se incrementa significativamente tras un daño cardíaco, destacando la capacidad de las Bmi1-CSCs para contribuir a la reparación del corazón adulto después de una lesión.

Nuestros resultados permiten proponer un papel central de Bmi1 en la definición de la población de células madre cardíacas (Bmi1-CSCs) que participa en la renovación de los cardiomiocitos en el corazón adulto. Futuras investigaciones ayudarán a identificar y validar los factores críticos para incrementar su potencial en terapia celular cardíaca.

SUMMARY

The adult mammalian heart was long considered a terminally differentiated organ with no capacity to replace aged or damaged cardiomyocytes. This traditional view was challenged by amassing evidence of low but intrinsic cardiomyocyte turnover in the adult mouse heart. However, the contribution of adult cardiomyocyte turnover to heart homeostasis and the origin of the new cells remain unclear. Compelling evidence suggests that the low-rate turnover that heart exhibits throughout life mainly reflects the activity of a reservoir of cardiac stem cells (CSCs) that may reside in physiological niches.

Adult stem cells maintain and repair host tissues in adult organisms, and self-renewal, differentiation, and prevention of senescence of adult stem cells are thus critical for tissue homeostasis. Adult resident cardiac stem/progenitors have been defined primarily by the expression of cell surface markers such as c-kit or Sca-1. However, the diversity in the characterization of adult CSCs has hindered unambiguous identification and molecular definition of endogenous CSCs and to establish their definitive contribution to heart homeostasis.

Bmi1, a member of Polycomb repressive complex 1 (PCR1), is reported to play crucial roles during self-renewal and maintenance of hematopoietic, neural, intestinal, bronchioalveolar, pancreatic, prostate, lung and epithelial adult stem cells, and more recently in the tongue and in rodent incisors. Therefore, Bmi1 is considered the most established marker associated with adult stem cell activity.

Using a reliable lineage tracing strategy to track activity of the Bmi1 locus, we show here that adult heart contains a resident non-cardiomyocyte population of Bmi1-expressing stem cells (Bmi1-CSCs) that constitute a fraction of the Sca-1 population. Bmi1-CSCs show enriched expression for critical multipotency and stemness markers and exhibit capacity to differentiate to the main lineages of the heart *in vitro*. Bmi1⁺ cell numbers increase over the lifetime of the animals reinforcing their self-renewing capacity. Bmi1-CSCs are located in physiological niches and tracing their progeny over 2 years indicates that they contribute to the low-rate homeostatic turnover of cardiomyocytes. This activity is significantly increased in response to myocardial injury, highlighting the capacity of Bmi1-CSCs to contribute to repair of the adult heart after injury, but seem to play a minor role upon neonatal cardiac injury.

Our results allow us to propose a central role of Bmi1 in the definition of a population (Bmi1-CSCs) involved in cardiomyocyte turnover in the adult heart. Future research to better characterize the biology of Bmi1-CSCs will help to identify critical factors for harnessing their potential for effective cardiac cell therapy.

ÍNDICE

SUMARIO	1
ÍNDICE	9
ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN	19
TIPOS CELULARES DEL CORAZÓN	22
CORAZÓN COMO ÓRGANO POSTMITÓTICO	25
CAPACIDAD DE RENOVACIÓN DEL CORAZÓN ADULTO	28
<i>Evidencias indirectas de la actividad de células madre o progenitores en el corazón adulto</i>	28
<i>Capacidad de renovación del corazón adulto por cardiomiocitos proliferativos</i>	29
<i>Células madre residentes en el corazón adulto: CÉLULAS MADRE CARDÍACAS</i>	30
<i>C-kit (CD117)</i>	31
<i>Sca-1 (Ly6a)</i>	31
<i>Otras poblaciones de células progenitoras cardíacas</i>	32
EPIGENÉTICA Y CONTROL DE LA IDENTIDAD CELULAR: POLICOMB	33
<i>Bmi1</i>	37
<i>Papel de Bmi1 en la biología de las células madre adultas</i>	38
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA EL CULTIVO DE LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES	47
TAMPONES EMPLEADOS	49
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: MODELOS ANIMALES Y TAMOXIFENO	50
AISLAMIENTO Y CULTIVO DE DISTINTOS TIPOS CELULARES	51
<i>Células cardíacas Bmi1+ y Sca-1+</i>	51
<i>Cardiomiocitos neonatales de rata</i>	51
<i>Cardiomiocitos adultos de ratón</i>	52
CULTIVO DE EXPLANTES DE CORAZÓN ADULTO	53
ENSAYO DE CARDIOSFERAS	53
DIFERENCIACIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES	53
<i>Diferenciación endotelial y vascular</i>	53
<i>Diferenciación cardíaca</i>	54
ENSAYO DE CALCIO EN CARDIOMIOCITOS ADULTOS	54
CITOMETRIA DE FLUJO Y SEPARACIÓN CELULAR	55
<i>Citometría de flujo</i>	55
<i>Separación celular: FACS Y MACS</i>	56
RNASEQ Y TRANSCRIPCIÓN REVERSA-REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (RT-QPCR)	57
TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	59
<i>Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia</i>	59
<i>Hematoxilina/Eosina</i>	61
MODELOS DE DAÑO CARDÍACO	62
<i>Resección apical del corazón neonatal</i>	62
<i>Infarto agudo de miocardio en animales adultos</i>	62
ESTADÍSTICA	63
RESULTADOS	65
1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE CÉLULAS BMI1+ EN EL CORAZÓN ADULTO DEL RATÓN	67
1.1. <i>Análisis de las líneas transgénicas empleadas</i>	67
1.2. <i>Expresión de Bmi1 en el corazón adulto de ratón</i>	69
1.3. <i>Perfil de expresión de antígenos de superficie en la población Bmi1+</i>	71
1.4. <i>Aislamiento de las células Bmi1+, morfología y caracterización in vitro por inmunofluorescencia</i>	73

1.5. Caracterización de la expresión de <i>Bmi1</i> en el modelo de explante cardiaco.....	75
1.6. Potencial de formación de cardiosferas de las células <i>Bmi1</i> +.....	77
1.7. Estudio del potencial de diferenciación in vitro de las células <i>Bmi1</i> +.....	79
1.7.1. Potencial de diferenciación de las células <i>Bmi1</i> + hacia el linaje endotelial y vascular.....	79
1.7.2. Potencialcardiomiogénico de las células <i>Bmi1</i> +	82
1.8. Estudio del transcriptoma de las células <i>Bmi1</i> + del corazón adulto	84
2. TRAZADO DE LINAJE DE LAS CÉLULAS CARDÍACAS <i>Bmi1</i> +. IMPLICACIÓN EN LA RENOVACIÓN DE LOS CARDIOMIOCITOS DURANTE LA HOMEOSTASIS DEL ÓRGANO.....	91
2.1 Localización de las células <i>Bmi1</i> + en el corazón adulto.....	91
2.2. Capacidad de auto-mantenimiento de las células <i>Bmi1</i> +	94
2.3. Perfil de marcadores en las células YFP+ a lo largo de la vida del animal.....	96
2.4. Localización de las células YFP+ tras 2 meses de la inducción.....	99
2.5. Diferenciación in vivo de las células <i>Bmi1</i> + hacia el linaje endotelial	100
2.6. Potencial cardiomiogénico de las células <i>Bmi1</i> + in vivo	101
2.6.1. Detección de cardiomiocitos YFP+ mediante inmunohistoquímica.....	101
2.6.2. Aislamiento y análisis de cardiomiocitos YFP+ adultos	103
3. RESPUESTA DE LAS CÉLULAS MADRE <i>Bmi1</i> + FRENTE A DAÑO CARDÍACO. CONTRIBUCIÓN EN LA REGENERACIÓN DEL CORAZÓN	109
3.1. Respuesta de las células <i>Bmi1</i> + en un modelo de daño cardíaco neonatal.....	109
3.2. Papel de las células madre <i>Bmi1</i> + en un modelo de infarto agudo de miocardio en animales adultos.....	112
3.2.1. Estudio del transcriptoma de las células madre <i>Bmi1</i> + tras un infarto agudo de miocardio (IAM).....	112
3.2.2.Trazado de linaje de las células <i>Bmi1</i> + en un modelo de infarto agudo de miocardio	115
DISCUSIÓN	121
1.- EL CORAZÓN COMO ÓRGANO DINÁMICO: HOMEOSTASIS-REGENERACIÓN. ¿CÓMO DETECTARLA? ¿QUÉ TIPO CELULAR?	123
2.- <i>Bmi1</i> -CSCs EN EL CONTEXTO DE OTRAS POBLACIONES DE CÉLULAS MADRE CARDÍACAS.....	125
3.-ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MADRE <i>Bmi1</i> -CSCs <i>IN VITRO</i>	127
4. -ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS MADRE <i>Bmi1</i> -CSCs <i>IN VIVO</i>	130
5.-TRAZADO DE LINAJE: <i>Bmi1</i> -CSCs EN HOMEOSTASIS.	131
6.-PAPEL DE LAS <i>Bmi1</i> -CMCs EN UNA SITUACIÓN DE DAÑO CARDÍACO.	132
7.- <i>Bmi1</i> -CSCs EN EL CONTEXTO ACTUAL DEL CAMPO DE LA REGENERACIÓN CARDÍACA	134
CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA.....	141

ABREVIATURAS

AV: Nódulo Aurículo-ventricular.

Abcg2: *ATP-binding cassette, sub-family G, member 2.*

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARID: *AT-rich interaction domain.*

Bmi1: *B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site. Polycomb ring finger oncogene.*

BASCs: *Bronquioalveolar stem cells.*

β-gal: β galactosidasa.

Bmp: *Bone morphogenetic protein.*

BrdU: Bromodeoxiuridina.

C¹⁴: Carbono 14.

CBX: Homólogo cromobox.

Cbx2: *Cromobox homolog 2.*

Cbx4: *Cromobox homolog 4.*

Cbx7: *Cromobox homolog 7.*

CD31: *Platelet Endothelial cell Adhesion Molecule-1.*

CD45: *Leukocyte common antigen.*

CD133: *Prominin 1.*

CE: Células embrionarias.

CFU: *Colony forming units.*

CM: Cardiomiocito/s.

Cre: Recombinasa Cre

CSCs: *Cardiac stem celsl.*

Cx43: Conexina 43.

c-Kit (Cd117): *Tyrosine-protein kinase kit.*

c-myc: *V-myc myelocitomatosis viral oncogene homolog.*

Dppa5: *Developmental pluripotency associated 5.*

Ebf1: *Early B cell factor 1.*

Eed: *Embryonic ectoderm development.*

Esc: Subunidad del complejo represor de polcomb 2.

Ezh1: *Enhancer of zeste homolog 1.*

Ezh2: *Enhancer of zeste homolog 2.*

FACS: *Fluorescence-activated cell sorting.*

FGF1: *Fibroblast growth factor1.*

Foxg1: *Forkhead box G1.*

Gata4: *Gata binding protein-4.*

GFP: *Green fluorescent protein.*

H2AK119ub: Ubiquitinización de la lisina 119 de la histona H2A.

H3K4me3: Trimetilación de la lisina 4 de la histona 3.

H3K27me3: Trimetilación de la lisina 27 de la histona 3.

HSCs: *Hematopoietic stem cells.*

IAM: Infarto agudo de miocardio.

IdU: Yododeoxiuridina.

ISCs: *Intestinal stem cells.*

IPA: *Ingenuity Pathway Analysis.*

iPS: *Induced pluripotent stem cell.*

IRES: *Internal ribosome entry site.*

Islet1: Proteína Lim-homeodominio Islet1.

Jarid: *AT rich interactive domain 2.*

Klf2: *Krüppel-like factor 2.*

Lgr5: *Leucine-Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5.*

MACS: *Magnetic activated cell sorting.*

MAPK: *Mitogen-Activated protein kinases.*

Mdm2: *Transformed mouse 3T3 cell double minute 2.*

MDR: *Multiple drug resistance.*

MEC: Matriz extracelular.

Mef2c: *Myocyte enhancer factor 2C.*

Mel18: *Polycomb group ring finger 2.*

Myh6: *Myosin heavy chain 6.*

miRNA(s): Micro ácido ribonucleico.

Myocd: *Myocardin.*

N¹⁴: Nitrógeno 14.

N¹⁵: Nitrógeno 15.

Nkx2.5: *NK2 homeobox 5.*

NS: Nodo Sinusal.

NSCs: *Neural stem cells.*

Oct4: *Pou domain class 1 transcription factor.*

P16: Proteína 16 producto del gen Cdkn2a.

P19: Proteína 19 producto del gen Cdkn2a.

P21: Producto del gen Cdkn1a.

P53: Tumor supresor p53.

Pax5: *Paired box 5*.

PcG: Grupo policombo.

PCR1: *Polycomb repressive complex 1*.

PCR2: *Polycomb repressive complex 2*.

Pdfg α : *Platelet derived growth factor, α polypeptide*.

PE: *Phycoerythrin*.

PEST: *Peptide sequence that is rich in proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)*.

Ring1A: *Ring finger protein 1A*.

Ring1B: *Ring finger protein 1B*.

RE: Receptor de estrógeno.

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción reversa.

Sca-1 (Ly6a): *Stem cell antigen 1*.

S α A: α -actinina sarcomérica.

SEM: *Standard error of the mean*.

SET: *Derivación de Enhancer of zeste proteins*.

SMA: *Smooth muscle actin*.

SmMHC: *Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle*.

Sox2: *SRY (sex determining region Y)-box 2*.

Srf: *Serum response factor*.

SSC: *Side scatter*.

Suz12: Subunidad del complejo represor de policombo 2.

Tbx5: *T-box 5*.

Tgfb: *Transforming growth factor, beta 1*.

TM: Tamoxifeno.

TNNT: *Troponin T2, cardiac*.

TPM1: *Tropomyosin 1*.

TrxG: Grupo Trithorax.

Ve-cad: Ve-Cadherina.

YFP: *Yellow fluorescent protein*.

INTRODUCCIÓN

Aparentemente el corazón podría describirse como una sencilla y simple bomba que garantiza el aporte de oxígeno a nuestros tejidos, pero solo aparentemente. En perfecta sincronía, el corazón bombea la sangre a través de sus cámaras para conducirla por una red de arterias y venas que terminan en un complejo entramado de capilares. Es allí donde tiene lugar el intercambio de nutrientes y oxígeno a las células que los rodean permitiendo mantener, por tanto, las necesidades vitales de todo el organismo.

El corazón está formado por cuatro cavidades musculares independientes: dos aurículas, en la parte superior y dos inferiores, denominadas ventrículos. La mitad izquierda y derecha están separadas por un tabique denominado septo. Las contracciones cardíacas se suceden rítmicamente en lo que se denomina ciclo cardíaco. El ciclo cardíaco está compuesto por un acto de contracción seguido por un acto de relajación. El ciclo empezaría en la aurícula derecha que recibe la sangre poco oxigenada procedente de los tejidos, a través de las venas cava, superior e inferior derechas. La sangre poco oxigenada es bombeada desde la aurícula derecha al ventrículo derecho atravesando la válvula tricúspide. De allí la sangre es impulsada, tras la contracción ventricular, hacia los pulmones, por las arterias pulmonares, para oxigenarse. El recorrido que realiza la sangre poco oxigenada hasta los pulmones se denomina circulación menor. Una vez oxigenada, la sangre retorna al corazón por las venas pulmonares e ingresa en la aurícula izquierda; y de allí, al ventrículo izquierdo atravesando la válvula bicúspide. Este circuito recibe el nombre de circulación mayor. El ventrículo izquierdo es la cámara más musculada, ya que se requiere una fuerza extra, puesto que de esta cavidad la sangre oxigenada será repartida a todos los tejidos a través de la arteria aorta.

La perfecta sincronía con la que el corazón lleva a cabo la coordinación del flujo sanguíneo a través de contracciones rítmicas, es debida a la íntima interrelación de los distintos tipos celulares que lo componen. De esta manera y como se describirá más adelante, el corazón contiene un tipo celular encargado del latido del órgano: los cardiomiocitos. Las rítmicas contracciones cardíacas son debidas a la existencia de cardiomiocitos especializados encargados de desencadenar, de manera espontánea, la onda eléctrica que dirigirá la contracción del corazón en la manera requerida para una correcta circulación sanguínea.

La mayor parte de los tipos celulares que componen el corazón se encuentran en la porción anatómica denominada miocardio. Así el corazón estaría compuesto por tres capas de tejido: el endocardio, el miocardio y el epicardio.

El endocardio es una fina capa formada por células epiteliales cuya función es recubrir el lumen de las cavidades internas del corazón, a modo de película protectora. El epicardio recubre la parte externa del corazón y está formado mayoritariamente por tejido conjuntivo y adiposo. Finalmente, el miocardio es la capa intermedia y más gruesa, formada por diferentes tipos celulares. Los cardiomiocitos se disponen en el miocardio formando un complejo entramado que constituye el músculo cardíaco o músculo esquelético estriado.

TIPOS CELULARES DEL CORAZÓN

La infalibilidad con la que el corazón lleva a cabo su función y, en consecuencia, que el sistema funcione en perfecta sincronía es debido a la íntima interacción de los tipos celulares que lo conforman. La integración de las propiedades particulares de los tipos celulares hace que el órgano funcione como un todo.

Las células endoteliales junto con las células musculares lisas constituyen la arquitectura del sistema circulatorio cardíaco. El músculo esquelético requiere del aporte de oxígeno y nutrientes para garantizar su correcto funcionamiento. Así, de la base de la aorta emergen dos arterias, denominadas arterias coronarias, que se ramifican por la pared del corazón y garantizan las necesidades metabólicas de todas las células del órgano. Las células endoteliales se disponen en la luz de los vasos; mientras que las células musculares lisas constituyen la capa más interior de los vasos. Las células endoteliales controlan el tono muscular; y esto, por tanto, afecta a cómo las células musculares responden a la presión parcial de oxígeno, la concentración de glucosa en sangre y otras variables metabólicas. En este sentido, las células endoteliales pueden regular el tamaño de los vasos en un determinado momento, lo cual determina la cantidad de sangre que circula a través de él.

Los andamios del corazón en los que se anclan las células, se componen de una matriz extracelular compleja (MEC). Esta matriz acelular (Borg et al., 1996), constituye una red tridimensional formada por colágenos, proteoglicanos, glicoproteínas, citoquinas, factores de crecimiento y proteasas (Bowers et al., 2010). La MEC juega un papel crítico en la transmisión de la información desde el ambiente extracelular hacia las células embebidas en ella. El papel que la MEC juega en la naturaleza del órgano es tal que, en los inicios de la enfermedad cardiovascular, la matriz influencia la forma celular, función y/o fenotipo de las células cardíacas que sostiene. La remodelación de la MEC, debido a las proteasas que residen en ella, juega un papel decisivo tanto para el mantenimiento de los propios elementos que constituyen la MEC durante el desarrollo (Alexander & Werb, 1989) y la homeostasis (Tremble et al., 1995) como en las enfermedades cardiovasculares (Alexander & Werb, 1989).

El principal tipo celular responsable de la producción de los componentes de la MEC es el fibroblasto cardíaco. Este tipo celular es el más abundante presente en el corazón, llegando a representar el 55% del total de células cardíacas (Banerjee et al., 2007). La principal función que desempeñan los fibroblastos es la síntesis y deposición de los componentes de la MEC, la síntesis y secreción de enzimas encargadas de su degradación y/o auto mantenimiento y la generación de tensión mecánica en la red de colágenos (Borg et al., 1996; Reed et al., 1992; Weber, 1995). Para poder desempeñar su función, los fibroblastos necesitan anclarse en la matriz. Para ello, están dotados de un conjunto de integrinas localizadas en la membrana plasmática que les permite el anclaje en la propia matriz que ellos secretan. Los fibroblastos son células del tejido conectivo

denominadas centinelas ya que pueden detectar, sentir, los cambios químicos, mecánicos y las señales eléctricas generadas por los cardiomiocitos y responder adecuadamente, manteniendo así la naturaleza eléctrica, química y biomecánica del órgano. Dado que el fibroblasto es el tipo celular con mayor representación en el corazón, se disponen entre los paquetes de cardiomiocitos (Gaudesius et al., 2003) y no son eléctricamente excitables; cabría entonces preguntarse cómo es posible que no interfieran en la propagación del impulso cardíaco. Los fibroblastos cuentan con propiedades particulares con el fin de ser efectivos en la transducción de la señal mecánico-eléctrica en vez de ser un obstáculo (Kohl et al., 1992). Los fibroblastos cardíacos poseen canales iónicos permeables al Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Hu & Sachs, 1997) que permiten la continuidad de la señal eléctrica a través de sus membranas. Es por ello que, a pesar de que este tipo celular se localice entre las fibras del músculo cardíaco, sus propiedades permiten una correcta transducción de las señales electro-mecánicas.

El otro tipo celular más representado y el encargado de la contracción del corazón es el de los cardiomiocitos (45%, (Banerjee et al., 2007)). Los cardiomiocitos se organizan en una compleja red tridimensional que conforma el músculo estriado cardíaco. Este músculo se agrupa formando fascículos, adyacentes a fibroblastos, vasos sanguíneos y embebidos en la matriz extracelular. Actualmente el miocardio está ampliamente considerado como una estructura continua en la que la orientación y la dirección de las fibras musculares cardíacas varía suavemente a lo largo de las paredes ventriculares con el fin de garantizar una eficiente contracción muscular y continuidad en el impulso eléctrico. Esta compleja organización favorece el latido sincrónico del corazón (LeGrice et al., 1995). Cada cardiomiocito contiene un haz de miofibrillas dividida en unidades contráctiles, o sarcómeros, que consisten en diversas proteínas contráctiles incluyendo entre otras la actina y la miosina (Gregorio & Antin, 2000; Marston & Redwood, 2003). Una característica particular del músculo cardíaco es la presencia de bandas oscuras, irregularmente espaciadas entre los miocitos, conocidas como discos intercalados. Desde un punto de vista mecánico, estas estructuras se corresponderían con el "pegamento" que permitiría que la fuerza de contracción se transmitiera de un cardiomiocito al siguiente, ya que contienen sitios de unión con actinas y filamentos intermedios.

Por tanto, los cardiomiocitos se encuentran unidos formando fibras que globalmente constituyen el músculo esquelético cardíaco. Para que la onda eléctrica se propague correctamente por el miocardio, es necesario que los cardiomiocitos estén dotados de propiedades particulares que permitan una correcta polarización y despolarización de la membrana, con el fin de generar un potencial de acción que se desplace como una onda por todo el corazón.

Así, el potencial de acción de estas células se origina por la apertura de dos tipos de canales iónicos: los canales rápidos de sodio y los canales lentos de calcio. La entrada de ambos iones en el citoplasma hace que la membrana se despolarice y la célula cardíaca se contraiga. La señal entre los cardiomiocitos adyacentes se propaga gracias a las uniones localizadas en los discos

intercalados. Se trata de canales iónicos denominados conexinas. Las conexinas 40 y 43 son las más abundantes en estas uniones, permitiendo el paso de iones y pequeñas moléculas que garantizan la continuidad de la señal eléctrica, la cual pasa prácticamente sin ningún impedimento.

Por tanto el músculo cardíaco se puede considerar un sincitio en el que las células que lo componen están perfectamente interconectadas. De hecho, el corazón está compuesto por dos sincitios: el auricular (constituye las paredes de las aurículas) y el ventricular (constituye las paredes de los ventrículos).

Las propiedades únicas de los cardiomiocitos hacen que la onda de despolarización se propague para permitir un latido sincrónico. Sin embargo, ¿cómo y dónde se origina esta onda eléctrica?

El corazón está dotado de un sistema especial para generar impulsos eléctricos, formado por fibras musculares especializadas que conforman el sistema de excitación y de conducción. Este sistema está formado por: el Nódulo Sinusal (NS, de Keith-Flack), las vías internodulares, el Nódulo Aurículo-Ventricular (AV, de Aschoff-Tawara), el Haz Aurículo-Ventricular (de His, que se bifurca en ramas derecha e izquierda) y las fibras de Purkinje. Las fibras cardíacas del nódulo sinusal o marcapasos cardíaco tienen la capacidad de autoexcitarse y producir descargas que provocan las contracciones rítmicas autónomas del corazón. Aquí se produce un retraso en la conducción del impulso (de aproximadamente 0,13 segundos), para que las aurículas tengan tiempo de vaciar su contenido hacia los ventrículos antes de que comience la contracción ventricular. La causa del retraso se debe a la disminución de las uniones gap entre las células del nódulo AV y del haz de His. La conducción a través del haz de His es unidireccional hacia las fibras de Purkinje. Estos cardiomiocitos presentan un gran número de uniones gap, muy permeables; lo que permite una transmisión casi instantánea (0,03-0,06 segundos) del impulso a todo el músculo ventricular. Esto comporta que todas las porciones de los ventrículos comiencen a contraerse casi al mismo tiempo, hecho fundamental para que el corazón pueda cumplir su rol de bomba eficaz y en continuo.

A pesar de que el marcapasos cardíaco tiene autonomía y es capaz de generar autónomamente la onda eléctrica, la eficacia de su función está controlada por los nervios simpáticos y parasimpáticos (nervios vagos). El sistema nervioso simpático y parasimpático, se encargan de incrementar y reducir el ritmo cardíaco respectivamente. Los nervios vagos contactan principalmente con los nódulos NS y AV y tienen poca representación en el músculo auricular y casi nula en el músculo ventricular. Por otra parte, los nervios simpáticos se distribuyen en todas las regiones del corazón, con una intensa representación en el músculo ventricular. Los efectos del simpático sobre el corazón se deben tanto a modificaciones de la frecuencia como a modificaciones de la fuerza contráctil (aumento). En cambio, los efectos del parasimpático se basan principalmente en modificaciones de la frecuencia (disminución).

Por tanto, la visión de un corazón como una sencilla bomba se ve ampliamente superada cuando se analiza en detalle el entramado de elementos que lo componen. Existe una íntima y coordinada interacción entre todos ellos, convirtiendo al órgano en un todo, capaz de generar autónomamente

el impulso eléctrico que desencadena la sincrónica contracción del músculo garantizándonos las necesidades metabólicas.

CORAZÓN COMO ÓRGANO POSTMITÓTICO

Homeostasis (del griego *homo* que significa "similar" y *estasis* "estado", ("estabilidad")) en fisiología se define como el conjunto de fenómenos de autorregulación que permiten el mantenimiento de las propiedades y la composición interna de un órgano. Este equilibrio dinámico se alcanza gracias a constantes cambios necesarios para mantener el funcionamiento normal de un órgano. La plasticidad de un órgano es entendida como los cambios en composición y propiedades sufridos por el mismo para responder ante distintos requerimientos funcionales. Por otra parte, la capacidad de regeneración de un órgano, viene definida por la respuesta ante un daño y el desencadenamiento del proceso reparativo que conlleva una recuperación de la estructura tisular. Todos estos procesos requieren, entre otros factores, el mantenimiento de las células sanas, la eliminación de las células dañadas o defectuosas y la generación de células nuevas que mantengan, recuperen o reformen el órgano en las distintas condiciones.

Los cambios necesarios para mantener el equilibrio dinámico en homeostasis, la plasticidad para responder ante determinados requerimientos y la capacidad de regeneración ante un daño varían sustancialmente tanto entre órganos como entre organismos; y para un mismo órgano varía en las distintas etapas de desarrollo y a lo largo de la vida del individuo. ¿Qué sucede en el corazón adulto de los mamíferos?, ¿cómo responde ante las distintas situaciones?.

Desde 1850 hasta el primer cuarto del siglo XX, la observación de que el corazón adulto de mamíferos, era capaz de responder ante determinados daños o presiones incrementando su tamaño, llevó al concepto de que el órgano podía sufrir un proceso de hiperplasia, como resultado de la proliferación de sus células. Sin embargo, en 1925 Karsner y cols. examinaron en detalle el número de fibras cardíacas de corazones humanos hipertrofiados, como consecuencia de patologías cardíacas. Comparando corazones hipertrofiados y sanos, los autores no pudieron detectar diferencias respecto al número de fibras cardíacas (Karsner et al., 1925). Por tanto, el aumento de tamaño del corazón, sólo podría ser explicado por un incremento en el tamaño de los cardiomiocitos (hipertrofia) y no como consecuencia de un proceso proliferativo (hiperplasia). Posteriormente Macmahon y cols. corroboraron esta hipótesis (Macmahon, 1937).

Tras estos estudios, el corazón adulto era contemplado, globalmente, como un órgano terminalmente diferenciado, postmitótico, compuesto por células sin capacidad de proliferar y sin presentar una clara y evidente habilidad para regenerarse después de un daño. Hay que destacar que

la mayoría de los trabajos han centrado su investigación en el papel de los cardiomiocitos puesto que éstos son responsables directos (efectores) de la actividad contráctil del corazón.

Hasta esa fecha se creía que el número máximo de cardiomiocitos se alcanzaba poco después del nacimiento del animal, tras el cual, su número disminuía progresivamente. Sin embargo, anotaciones procedentes de corazones de niños que sufrían alguna patología cardíaca sugerían que existían células mitóticas en el miocardio (Macmahon, 1937). Estos datos apuntaban a un posible proceso proliferativo, además del típico proceso hipertrófico. El hecho de que los individuos jóvenes pudieran albergar cierta plasticidad fue corroborada por un trabajo realizado en ratas en 1956. Robledo y cols. detectaron células en proceso mitótico en el corazón de ratas de 4 a 7 días de edad a las que previamente se les había inducido un daño cardíaco (Robledo, 1956).

Los datos de hiperplasia recogidos en animales jóvenes con patologías o daños cardíacos abrían una ventana de esperanza en el campo aunque la tendencia generalizada era seguir creyendo que el corazón adulto no albergaba ninguna plasticidad.

Una de las primeras evidencias que demostraron que, no solamente el corazón de los individuos jóvenes albergaba una potencialidad para la generación de nuevos cardiomiocitos, sino también el adulto, la aportó en 1960 Linzbach. Estudiando la longitud de las fibras cardíacas, descubrió que éstas no variaban entre corazones humanos normales, hipertróficos y/o dilatados (Linzbach, 1960). Sin embargo, cuando el corazón excedía de 500gr, como consecuencia de una sobrecarga patológica, había un incremento en el número de fibras cardíacas. Estos resultados fueron corroborados casi 20 años después por los descubrimientos de Astorri y cols. (Astorri et al., 1977).

En los años posteriores, la presencia de células mitóticas se documentó en corazones que no habían sufrido ningún tipo de daño cardíaco. De hecho, el trabajo de Sasaki y cols. en 1968 demostró que entre el 1-2% de los cardiomiocitos de rata podían dividirse hasta las 4 semanas de vida (Sasaki et al., 1968). Estos hechos fueron confirmados por el trabajo de Zak (Zak, 1974).

Especialmente el trabajo de Zak, ayudó en el proceso de renovación que estaba experimentando el campo. Fue uno de los primeros investigadores en observar proliferación de células no cardiomiocíticas en un modelo de sobrecarga. Este hallazgo implicaba que las células conectivas podrían proliferar activamente.

El corazón no sólo parecía albergar una limitada, pero real capacidad intrínseca regeneradora tras un daño cardíaco, sino que en una situación fisiológica de homeostasis se había demostrado una actividad mitótica en él.

Siguiendo con esta corriente, han surgido diversos trabajos apoyando el concepto de una plasticidad cardíaca respecto al recambio de los cardiomiocitos durante la homeostasis del órgano. Uno de los trabajos más revolucionarios que abrieron las puertas definitivamente a la idea de que el

corazón es un órgano dinámico fue Bergamnn. Aprovechándose de la integración en el ADN, del isótopo del C¹⁴ generado durante las pruebas de la bomba atómica en la guerra fría, pudo estimar la edad de los cardiomiocitos que conformaban el corazón humano. Bergamnn descubrió que alrededor del 1% son recambiados anualmente en individuos jóvenes mientras que el porcentaje disminuye con la edad, llegando a 0.45% a los 75 años (Bergmann et al., 2009).

En conjunto y, finalmente, se ha podido demostrar que el corazón, a lo largo de la vida del organismo, es capaz de reemplazar parte de los cardiomiocitos que lo conforman. Sin embargo, el consenso general es que, la incompleta capacidad del órgano para regenerarse después de haber sufrido un daño, se ve soportado por la imposibilidad de proliferación de los cardiomiocitos debido a su patrón de nucleación (Laflamme & Murry, 2011). Así pues, la síntesis de ADN en cardiomiocitos neonatales está asociada a la duplicación celular (Brodsky et al., 1980; Clubb & Bishop, 1984) mientras que a partir de la primera semana de vida postnatal, la síntesis está asociada con la binucleación (Soonpaa et al., 1996). Este proceso de binucleación compromete la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos.

Además de este hecho, hay que añadir que algunas de las controversias que aún existen acerca de la capacidad proliferativa de las células cardíacas, especialmente, de los cardiomiocitos, surgen como consecuencia del desafío técnico que supone distinguir entre reparación, replicación de ADN y tipo celular que prolifera. En esta línea, muchos trabajos han asumido como indicativo de una reentrada en el ciclo celular de los cardiomiocitos, la incorporación de los análogos BrdU o IdU en su material genético (Beltrami et al., 2001; Kajstura et al., 1998). Sin embargo, la incorporación de estos análogos al ADN no acontece exclusivamente cuando la célula se replica sino también ante mecanismo de reparación nuclear (Sedmera & Thompson, 2011) o incluso, después de un infarto, donde las células pueden incrementar el contenido de su material genético (ploidia) (Adler & Friedburg, 1986). Estas asunciones sobreestiman el porcentaje de células que podrían llevar a cabo la división celular.

La necesidad de estudiar en profundidad la naturaleza de las células implicadas en la renovación del órgano empleando nuevas aproximaciones y metodologías ha llevado a la consolidación de dos corrientes principales. Una apoyaría que la proliferación de cardiomiocitos adultos es la principal responsable de la renovación del órgano; mientras que otra estaría a favor de las células madre/progenitoras cardíacas serían las encargadas de generar nuevos cardiomiocitos.

CAPACIDAD DE RENOVACIÓN DEL CORAZÓN ADULTO

Evidencias indirectas de la actividad de células madre o progenitores en el corazón adulto

Dos trabajos realizados en el grupo del Dr. Richard Lee, utilizando un modelo de infarto de miocardio, para evaluar la capacidad del corazón de responder ante un daño severo, sugieren la presencia de una población residente de células progenitoras en el corazón adulto con potencial cardiomiogénico (Hsieh et al., 2007; Loffredo et al., 2011).

En estos trabajos se utilizó el modelo Myh6-MerCreMer/ZEG (Fig. 1). En este modelo bitransgénico, todas las células expresan el gen de la β -galactosidasa (β -gal) pero tras la inducción con tamoxifeno aquellas células que expresan el gen Myh6 –teóricamente los cardiomiocitos– expresan irreversiblemente la proteína fluorescente GFP. Este modelo permite, indirectamente, trazar si los nuevos cardiomiocitos proceden de cardiomiocitos preexistentes, marcados, tras la inducción, con GFP, o proceden de células madre o progenitoras no inducidas por no expresar el gen Myh6. Hsieh y cols., tras un infarto, observaron una reducción significativa en el porcentaje de cardiomiocitos GFP+ y por el contrario, un aumento en el porcentaje de cardiomiocitos β -gal+. Estos hechos eran congruentes con la teoría de la existencia de una población de células cardíacas progenitoras (GFP-) encargadas de responder ante una situación de daño con la formación de nuevos cardiomiocitos (β -gal+). Sin embargo, en este estudio no fueron capaces de establecer la identidad molecular o la localización anatómica de estos progenitores cardíacos (Hsieh et al., 2007). En un trabajo posterior, Loffredo y cols. demostraron que tras la inyección intramiocárdica de células c-kit+ de médula ósea, en un corazón infartado, éstas eran capaces de activar y estimular a las células progenitoras cardíacas residentes con la subsecuente generación de nuevos cardiomiocitos (aumento en el número de cardiomiocitos β -gal+) e incrementar la función ventricular; este efecto no sucedía cuando se inyectaban células mesenquimales (Loffredo et al., 2011). A través de diversos métodos, los autores descartan que los nuevos cardiomiocitos provengan de la transdiferenciación de las células c-kit medulares inyectadas en el corazón y concluyen que la activación de las células progenitoras endógenas se debería a un efecto paracrino de las células de la médula ósea sobre los progenitores residentes. Sin embargo, tampoco en este trabajo fueron capaces de identificar la naturaleza de las células progenitoras cardíacas.

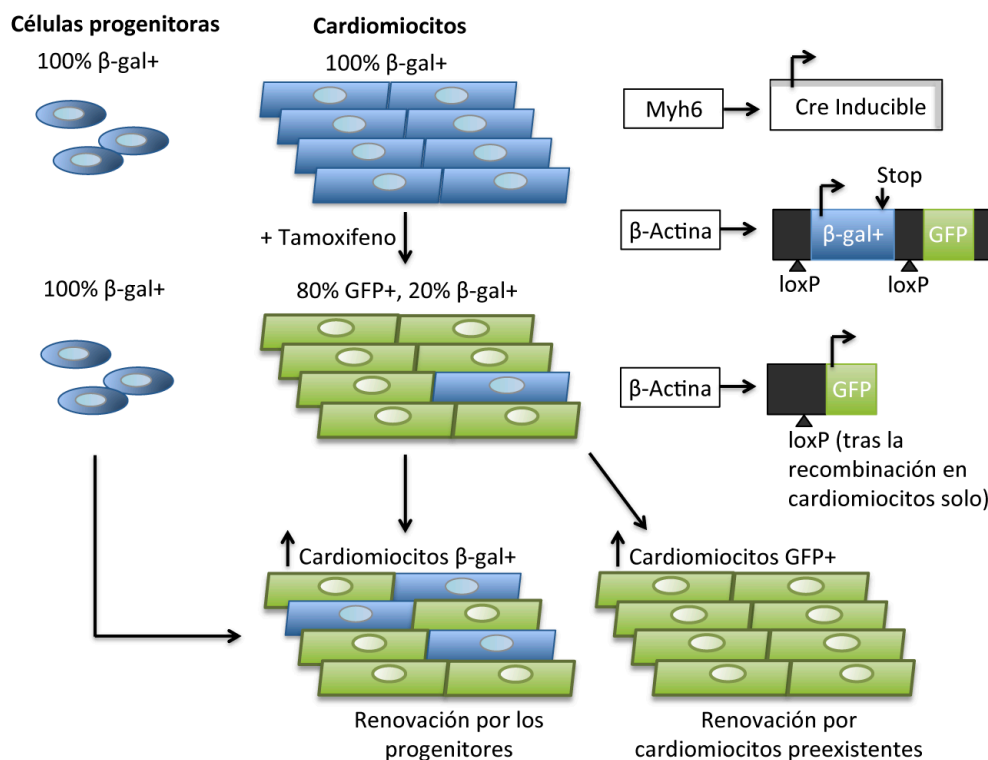


Figura 1. Mapeo genético en la regeneración cardíaca.

Ratón doble transgénico en el que el promotor del gen *Myh6*, específico de cardiomiocitos maduros, conduce la expresión de la recombinasa *Cre*, inducible por tamoxifeno. La escisión, mediada por *Cre*, de los sitios *loxP* que flanquean la secuencia de parada de lectura, lleva a un cambio irreversible, en la expresión constitutiva de la β-galactosidasa (β-gal) hacia la expresión constitutiva de GFP. Tras el tratamiento con el tamoxifeno, ~ 80 % de los cardiomiocitos se convierten en GFP+ mientras el 20% permanece β-gal+GFP-. Las células progenitoras deben permanecer GFP- después del pulso tamoxifeno ya que, en teoría, no expresan *Myh6*. Durante el envejecimiento normal del órgano, o tras un daño podría distinguirse si los nuevos cardiomiocitos creados proceden de los ya existentes (GFP+) o siguen expresando β-gal debido a que provienen de células no marcadas, (GFP-) desde el reservorio progenitor. Adaptada de (Laflamme & Murry, 2011).

Capacidad de renovación del corazón adulto por cardiomiocitos proliferativos

Dos trabajos recientes han mostrado el papel de la proliferación de los cardiomiocitos en la respuesta frente a un daño cardíaco. Estos trabajos se han llevado a cabo en el grupo del Dr. Richard Lee y en el del Dr. Eduardo Marbán (Malliaras et al., 2013; Senyo et al., 2013). Ambos grupos revisitan la idea de que los cardiomiocitos adultos son capaces de proliferar mediante un proceso de división directa o por un proceso de de-diferenciación y proliferación que daría lugar a más cardiomiocitos maduros. Ambos grupos emplean un sistema (Fig. 1) que les permite distinguir entre un recambio de cardiomiocitos procedente de cardiomiocitos preexistentes o de una población de células progenitoras cardíacas. La principal novedad incorporada por el grupo del Dr. Richard Lee es la adición del isótopo N^{15} en su estudio. El isótopo se incorpora en los núcleos cuando las células replican su material genético permitiendo la detección de aquellas que están proliferando.

Conociendo la relación natural del N^{14}/N^{15} , mediante una técnica de imagen multi-isótopo y espectrometría de masas, son capaces de detectar los cardiomiocitos que se dividen para dar lugar a nuevos cardiomiocitos. Ambos grupos, usando el mismo modelo transgénico, pero metodologías distintas, obtienen conclusiones similares: en la vida del animal, en un proceso de homeostasis natural, la generación de nuevos cardiomiocitos se debe exclusivamente a la proliferación de cardiomiocitos preexistentes mononucleares y no a un reservorio de células progenitoras cardíacas.

El hecho de que los cardiomiocitos adultos puedan albergar cierta capacidad para proliferar ha llevado a que en los últimos años se hayan desarrollado estudios para potenciar su eficiencia mitótica. Así, el grupo del Dr. Keating demostró que la adición exógena del factor de crecimiento FGF1 conllevaba a una re-entrada en el ciclo celular de cardiomiocitos adultos, a través de la actuación de FGF1 sobre la ruta p38 MAPK (Engel et al., 2006). Por otro lado, en el grupo del Dr. Kühn mostraron cómo la neuregulina-1 promovía la proliferación de los cardiomiocitos en el corazón adulto a través la activación de los receptores de la proteína kinasa erbB2/4 (Bersell et al., 2009). La neuregulina promovería tanto la síntesis del ADN de las células como su citoquinesis completa (Braun & Dimmeler, 2009). Por otro lado, Kuhn y cols., mostraron el papel de la periostina, una proteína de la matriz extracelular, en la inducción de la entrada en ciclo de los cardiomiocitos de rata (Kuhn et al., 2007).

Así pues, los cardiomiocitos adultos podrían albergar una cierta capacidad para proliferar. Pero para explicar el potencial intrínseco de auto-mantenimiento del corazón debe de existir otra fuente que juegue un papel más preponderante dados los índices de proliferación tan bajos presentados por estas células (Soonpaa & Field, 1997, 1998).

Células madre residentes en el corazón adulto: CÉLULAS MADRE CARDÍACAS

Al igual que en otros tejidos, donde se han localizado células madre adultas encargadas de la renovación del órgano (médula ósea, intestino, músculo esquelético, cerebro, etc.), han ido surgiendo numerosos trabajos con el objetivo de identificar la población o poblaciones no cardiomiocíticas, poseedoras de un potencial cardiomiogénico, encargada/s de mantener el órgano.

Las células madre adultas, se definen por ser células indiferenciadas que se encuentran predominantemente en un estado de quiescencia (Li & Bhatia, 2011). Las células madre exhiben propiedades clonogénicas, proliferativas, se auto-mantienen a lo largo de la vida del organismo en el órgano que las acoge, dan lugar a células progenitoras y células diferenciadas y regeneran/reparan el tejido después de un daño (Korbling et al., 2003; Li & Bhatia, 2011; Potten & Loeffler, 1990).

Diversos estudios han identificado diferentes poblaciones celulares en el corazón adulto con propiedades de células madre cardíacas. Así, numerosos trabajos se han basado en marcadores de superficie, que ya habían servido para identificar células madre adultas en otros tejidos y se han definido células progenitoras cardíacas por la expresión de diferentes marcadores de superficie, tales como, Sca-1 y c-kit.

C-kit (Cd 117)

El primer estudio que señaló la posible existencia de una población de células progenitoras en el corazón adulto se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Piero Anversa utilizando la expresión del marcador de superficie c-kit en corazones adultos de rata (Beltrami et al., 2003). En este trabajo se mostró cómo estas células, que carecen de la expresión del marcador hematopoyético CD45, eran clonogénicas y multipotentes al diferenciarse *in vitro* hacia los linajes de músculo liso, endotelio y cardiomiocitos. En un modelo de daño cardíaco basado en la ligación permanente de la arteria coronaria izquierda, cuando las células c-kit⁺ eran inyectadas en el área de infarto, éstas eran capaces de injertar y diferenciarse en cardiomiocitos y células vasculares (Beltrami et al., 2003).

Desde la primera identificación de células c-kit⁺ en el corazón de roedores, otros grupos han probado su existencia en otras especies como la felina, canina y humana (Bearzi et al., 2007; Chen et al., 2007; Linke et al., 2005). Es destacable comentar dos trabajos realizados por los grupos de los Drs. Sussman y Kotlikoff (Fransioli et al., 2008; Tallini et al., 2009). Ambos trabajos estudiaban la presencia de células c-kit⁺ en corazones de ratón con un modelo transgénico directo, en el que la secuencia codificante de la proteína GFP se encuentra insertada en el primer exón del gen c-kit. Ambos trabajos concluyen que la presencia de células c-kit⁺ se ve incrementada en la etapa postnatal pero luego disminuye rápidamente. De hecho, en la etapa adulta, la expresión de c-kit se detecta casi exclusivamente en células mononucleares aisladas pero también en células comprometidas y/o diferenciadas, como en cardiomiocitos (Fransioli et al., 2008). Tras un modelo de daño cardíaco (crioinfarto), tanto en animales neonatales como en adultos, el número de células c-kit⁺ aumenta en el corazón y contribuyen en la formación de nuevos vasos sanguíneos (Fransioli et al., 2008; Tallini et al., 2009). Sin embargo, hoy en día, todavía no se ha realizado un estudio de trazado de linaje con el promotor c-kit con el fin de esclarecer el papel de este gen en la biología del corazón.

Sca-1 (Ly6a)

La presencia del antígeno de superficie-1 ha servido para la caracterización y el aislamiento en el corazón adulto de una población definida por su expresión (Oh et al., 2003). Estas células están caracterizadas por ser negativas para CD45 y c-kit pero positivas para CD31, Gata 4 y Mef2c, sugiriendo su potencialidad para diferenciarse hacia el linaje cardíaco y endotelial. Matsuura y cols., demostraron que la adición de oxitocina al medio de cultivo, potenciaba la expresión de

factores de transcripción cardíacos y proteínas de contractilidad, que se organizaban para permitir el latido espontáneo (Matsuura et al., 2004).

Recientemente el grupo del Dr. Thomas Braun ha demostrado, mediante estudios de trazado de linaje bajo el promotor Sca-1, la presencia de una población Sca-1⁺ en el corazón adulto de ratón, capaz de participar en el proceso de renovación del órgano. Estas células poseen potencial para contribuir a los linajes endotelial, muscular y cardiomiocítico *in vivo* (Uchida et al., 2013). Los autores demuestran mediante un sistema directo de Sca-1-GFP que los cardiomiocitos carecen de expresión de Sca-1. En condiciones de homeostasis, estas células contribuyen a la formación de nuevos cardiomiocitos pero no tienen un papel relevante después de un infarto agudo de miocardio. En este trabajo los autores concluyen que debido a la heterogeneidad de la población Sca-1⁺ ha de existir una sub-población que sea la que retenga la propiedad de generar nuevos cardiomiocitos.

Otras poblaciones de células progenitoras cardíacas

Adicionalmente se han caracterizado poblaciones progenitoras cardíacas definidas mediante determinadas propiedades fisiológicas.

Uno de los criterios ampliamente utilizado en el campo de las células madre adultas, está basado en la expresión de unos transportadores localizados en la membrana celular. Estos transportadores confieren la habilidad de realizar el transporte activo de determinados compuestos, como el *Hoescht 3342*. Los genes que codifican para estas proteínas se denominan **multiple drug resistance (MDR)** y, entre ellos, el más conocido es el *Abcg2* (Challen & Little, 2006). La caracterización de esta población (*Abcg2*⁺) en corazón reveló que expresan el marcador Sca-1 pero tienen baja expresión de CD45 y c-kit (Martin et al., 2004).

Por otro lado, mediante la técnica de **explantes**, consistente en diseccionar el corazón en pequeños fragmentos y sembrarlos, tras haber realizado una digestión suave con enzimas proteolíticas, Messina y cols. fueron capaces de aislar una fracción de células brillantes y redondeadas que migraban de los explantes sobre la capa de fibroblastos emergentes. Estas células fueron aisladas, por los autores, mediante características morfo-fisiológicas: células pequeñas, esféricas y brillantes localizadas en la parte superior de la capa celular emergente. Tras ser recogidas de los explantes, las pequeñas células brillantes mostraban una remarcable capacidad para formar **cardiosferas** en suspensión. Al analizar mediante inmunocitoquímica diferentes marcadores en las células integrantes de las cardiosferas, los autores observaron que eran positivas para Sca-1 y c-kit (Messina et al., 2004). Estas estructuras tridimensionales podrían asemejarse a la arquitectura del nicho, donde residen originalmente las células en el tejido *in vivo* y por tanto, ayudar a preservar sus propiedades en el cultivo *ex vivo*. Sin embargo, la heterogeneidad en los marcadores de las

células integrantes de las cardiosferas parece variar dependiendo de las condiciones de cultivo. El trabajo del grupo del Dr. Giulio Cossu demostró que las células procedentes de explantes obtenidos de aorta y ventrículo tenían un mayor potencial de diferenciación hacia cardiomiocitos. Estas células expresaban Sca-1, c-kit y CD31 además de una expresión basal de marcadores cardíacos como Gata4, Nkx2.5 y Cx43. Se han denominado **mesangioblastos** (Galvez et al., 2008).

La expresión del marcador **Islet1** en corazones humanos fetales define una población de progenitores cardiovasculares capaces de dar lugar a los linajes cardiomiocítico, endotelial y de musculatura lisa. Estos progenitores una vez purificados y aislados del corazón son capaces de auto-mantenerse y expandirse antes de diferenciarse hacia los linajes predominantes del corazón (Bu et al., 2009).

Recientemente el grupo del Dr. Richard Harvey definió una población celular de origen epicárdico Sca-1+/CD31-/PDGFR α +, con capacidad de generar **unidades formadoras de colonias (CFU)**. Estas células son multipotentes y capaces de un crecimiento a largo plazo *in vitro*. Esta población celular, que ocupa un nicho perivascular, no parece presentar una capacidad destacable en la contribución al *turnover* fisiológico del órgano *in vivo* (Chong et al., 2011).

A pesar de los numerosos trabajos que han identificado diferentes poblaciones de células progenitoras cardíacas, las aproximaciones empleadas en su caracterización: aspectos morfo-fisiológicos, variedad en los marcadores de superficie, diferentes protocolos de aislamiento y cultivo, etc. han generado en el campo una gran confusión y controversia acerca de qué población recogería más fehacientemente las propiedades de la célula madre cardíaca de una manera indiscutible. Como se ha comentado anteriormente, es necesario llevar a cabo un abordaje diferente, empleando para ello estrategias de trazado de linaje con marcadores que recapitulen la esencia de las células madre, sin la necesidad de aislarlas y manipularlas *in vitro* y poder estudiar así, directamente, su potencialidad *in vivo*, bajo condiciones de homeostasis y tras daño cardíaco, conocer su jerarquía *in situ*, su regulación por miRNAs, cambios epigenéticos, etc.

EPIGENÉTICA Y CONTROL DE LA IDENTIDAD CELULAR: POLICOMB

Tanto durante el desarrollo embrionario, como en las células de un órgano adulto, la identidad celular es mantenida a través de funciones epigenéticas que previenen cambios en el programa de transcripción específico de los distintos tipos celulares. Las modificaciones epigenéticas se deben fundamentalmente a la metilación reversible del ADN, a la modificación post-traducciona l de las histonas y a la remodelación de la cromatina controlada por complejos multiprotéicos (Jaenisch & Bird, 2003) que se encuentran asociados al ADN.

Los principales elementos encargados de remodelar la cromatina son las proteínas del grupo Polycomb (PcG) y del grupo trithorax (trxG). Ambos grupos de proteínas son parte de un sistema de memoria celular, ampliamente conservado entre especies, que previenen cambios en la identidad celular, manteniendo patrones de transcripción establecidos, no sólo durante la etapa embrionaria, sino también a lo largo del desarrollo y durante la madurez. Por tanto, la estructura de la cromatina parece contener el *imprinting* molecular que subyace en la memoria celular y la herencia epigenética.

Los PcG fueron originalmente descritos en *Drosophila melanogaster* como genes implicados en el control de una correcta segmentación corporal (Lewis, 1978) mediante la modificación de la cromatina de determinados genes clave, como los genes de la familia *homeobox*. De hecho, los genes *homeobox*, conservados evolutivamente (Morey & Helin, 2010), juegan un papel crucial en las decisiones tomadas durante el desarrollo acerca de la información posicional de los segmentos. Estos patrones han de ser mantenidos y transmitidos por herencia de manera autónoma, a lo largo del desarrollo, de las células a sus descendientes para garantizar una continuidad en los patrones de transcripción concretos del tipo celular correspondiente (van Lohuizen, 1998).

Los componentes de los grupos PcG forman agregados multiprotéicos y constituyen complejos que se unen a determinados elementos del ADN, denominados elementos de respuesta a Polycomb, en los genes sobre los que ejercen su función represora.

Los complejos Polycomb mejor caracterizados son los PCR1 y PCR2 (Margueron & Reinberg, 2011). La ruta canónica de acción del complejo PCR1 está basada en la cooperación secuencial con PCR2 para finalizar en la represión génica. En este modelo, PCR2 es el encargado de reclutar los elementos del complejo PCR1 para dirigirlos a los promotores de sus genes diana. Por tanto, PCR2 sería el complejo iniciador y PCR1 el complejo que establece la represión. En mamíferos, PCR2 está formado por diversos componentes: Suz12, Esc, Eed, Ezh1 y Ezh2. Los dos últimos poseen una actividad metil-transferasa (responsable de la actividad enzimática del complejo) encargada de catalizar la trimetilación de la histona 3 en la lisina 27 (H3K27me3) a través de su dominio SET (Cao & Zhang, 2004a). Por otro lado, la proteína Eed se encarga de estabilizar el complejo (Cao & Zhang, 2004b). Todavía no está bien caracterizado el mecanismo por el cual los elementos del PCR2 se unen al ADN. Se cree que la proteína Jarid, mediante su dominio ARID, se uniría directamente a segmentos de ADN enriquecido en dinucleótidos GC y GA (Peng et al., 2009), y posteriormente, a través de Jarid se unirían los diferentes componentes de la familia PCR2 para trimetilar la histona 3 (Fig. 2A). La marca de metilación serviría como punto de acoplamiento para las proteínas con un cromodominio (CBX) ya que este dominio permite la unión a las histonas metiladas. La familia de proteínas CBX pueden funcionar como subunidades del complejo PCR1, de tal forma que contribuyen al reclutamiento del complejo PCR1 (Kaustov et al., 2011) (Fig. 2B).

La composición de los elementos que conforman el complejo PCR1 en mamíferos es mucho más diversa que en *Drosophila* y varía según el tipo celular. Las proteínas Mel18 y Bmi1 se encargan de controlar la acción enzimática del complejo (Cao et al., 2005). Esta actividad enzimática recae sobre los componentes Ring1A y Ring1B que son los encargados de ubiquitinar la lisina 119 de la histona H2A con un único grupo ubiquitina (H2AK119ub) (Wang et al., 2004) (Fig, 2C). Esta ubiquitinización permite mantener la represión de los genes diana e impedir su transcripción. Estudios recientes han demostrado que la condensación de cromatina no es dependiente de la marca de monoubiquitinización *per se*, sino de la propia presencia del complejo PCR1, el cual ayuda a la compactación de la cromatina (Francis et al., 2004) y dificulta su transcripción.

Los ratones trasngénicos *knock-out* para diversos integrantes de la familia PCR1 no muestran letalidad embrionaria, indicando un papel más redundante del complejo durante la etapa del desarrollo. Contrariamente, determinados miembros de PCR1 juegan un papel crucial en el mantenimiento de las células madre adultas ya que el silenciamiento del gen Bmi1 promueve una severa depleción de las células madre hematopoyéticas y neurales, entre otras (Molofsky et al., 2003; Park et al., 2003).

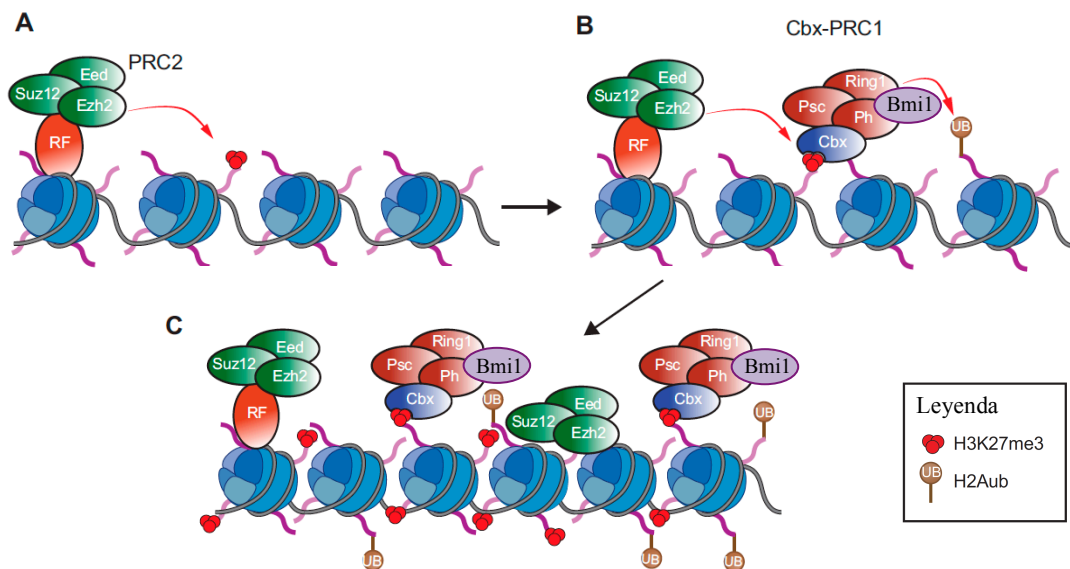


Figura 2. Funciones moleculares de PCR1 y PCR2.

(A) PCR2 decora la lisina 27 de la histona H3 con un grupo trimetil. Los factores de reclutamiento específicos (RF), como la proteína Jarid, son los responsables de la unión de PCR2 a los elementos genómicos. (B, C) Las proteínas CBX se unen a la marca H3K27me3 y reclutan los complejos de PCR1 a la cromatina, lo que conlleva a la deposición de la marca de monoubiquitinización en la lisina 119 de la histona H2A (H2Aub) (B) y a la compactación de la cromatina (C). Adaptada de (Aloia et al., 2013).

Los elementos de PCR2 tienen fundamentalmente una función muy relevante durante el desarrollo embrionario, lo cual queda reflejado y soportado por diversos estudios con células embrionarias (CE). La pérdida de Eed y Ring1B en CE afecta severamente a la expresión de genes de pluripotencia así como de auto-mantenimiento (Chamberlain et al., 2008; Endoh et al., 2008), a la vez que limita su habilidad para una correcta diferenciación. Por otro lado, los animales *knock-out* para Ezh2 y Suz12 presentan un profundo fallo en la generación de los linajes mesodérmicos y ectodérmicos, respectivamente (Pasini et al., 2004; Shen et al., 2008).

Parece contradictorio que el mismo complejo PcG esté implicado en procesos tan opuestos como son el auto-mantenimiento y la diferenciación de las CE. Lo que sucede es un cambio en la composición en las proteínas CBX de la ruta de PCR1 durante la transición de un estado indiferenciado a uno diferenciado. Cbx7 es el principal componente encargado de reclutar a PCR1 sobre los genes implicados en diferenciación durante la fase de auto-mantenimiento, mientras que, en el proceso de diferenciación hay un cambio por las proteínas Cbx2 y Cbx4, las cuales reemplazan a Cbx7, (Morey et al., 2012).

Es necesaria una fina regulación del genoma con el fin de controlar la expresión de los genes adecuados en el momento fisiológico celular apropiado. En este sentido, el control epigenético ejercido por las proteínas del complejo Polycomb juegan un papel clave en la represión genética, pero, debe haber un balance entre los genes activados y reprimidos. El complejo encargado de la activación transcripcional es la familia de proteínas Trithorax (trxG).

Al igual que PcG, los componentes de trxG depositan marcas de histona, pero en este caso, relacionadas con la activación transcripcional. Las proteínas del complejo trxG tienen actividad metiltransferasa asociada a sus dominios SET, encargados de metilar la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3), la cual representa una marca de activación (Bantignies et al., 2011).

Los modelos actuales proponen una complementación de ambos sistemas, de represión y activación, para permitir a la célula una rápida transición de un estado pluripotente a uno diferenciado. En las CE murinas existen regiones del ADN bivalentes decoradas con ambas marcas, de represión (H3K27me3) y de activación (H3K4me3) (Bernstein et al., 2006). Estas regiones no son exclusivas de CE ya que se han encontrado también en diversos tipos de células madre (Cui et al., 2009). El comportamiento global en estas regiones bivalentes es el de represión a pesar de estar decoradas con ambos complejos. Una refinada regulación de estos dominios bivalentes es esencial para una transición adecuada y eficaz de una célula pluripotente a una diferenciada.

El equilibrio en los sistemas epigenéticos permite a los organismos activar o reprimir genes clave para el correcto desarrollo de las funciones celulares en determinados momentos fisiológicos. Por tanto, los componentes de los grupos PcG y trxG son fundamentales para la correcta integración de

esta información durante toda la vida del organismo, y para dar una respuesta adecuada a las modificaciones del entorno.

Bmi1

B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site (Bmi1), es uno de los miembros centrales de la familia PCR1. Inicialmente Bmi1 fue identificado como un oncogen cooperador con c-myc en la iniciación de linfomas (Haupt et al., 1991; van Lohuizen et al., 1991). En humanos, Bmi1 se localiza en el cromosoma 10p11.23 y está compuesto por 10 exones. Codifica para una proteína de 36.9KDa de 326 aminoácidos. La proteína Bmi1 está compuesta por un dominio amino terminal *RING finger*, un dominio central *hélix-turn-helix-turn-helix-turn* y un extremo carboxi-terminal que contiene una secuencia PEST (van Lohuizen et al., 1991). Estas regiones cobran relevancia para la unión de Bmi1 a otros componentes del grupo PCR1 y poder así ejercer su función sobre el ADN (Hemenway et al., 1998).

Un target clásico de Bmi1 es el locus Ink4a/Arf. Este locus codifica para las proteínas supresoras de tumores P16^{Ink4a} y p19^{Arf}. Bmi1 actúa sobre ellas ejerciendo represión transcripcional. Ambas proteínas son capaces de bloquear la proliferación celular. Por una parte, p16^{Ink4a} es un inhibidor de ciclinas dependiente de quinasa que activa la ruta de retinoblastoma a través de la inhibición de la ciclina D-Cdk4/6. Por otra parte, p19^{Arf} induce la expresión de p53 mediante la inhibición de Mdm2 (Sharpless & DePinho, 1999; Sherr, 2001). Fibroblastos obtenidos de embriones *knock-out* para Bmi1 desarrollaron rápidamente procesos de senescencia celular debido a la sobreexpresión de p16 y p19. Por el contrario, la sobre expresión de Bmi1 conllevó a una disminución en la expresión de ambos genes (Itahana et al., 2003; Jacobs et al., 1999a). Bmi1 establece una conexión con sus dianas p16 y p19 silenciando su expresión y controlando así la regulación del ciclo celular y la senescencia (Jacobs et al., 1999a).

Además de su relación con el locus Ink4a/Arf, los animales *knock-out* para Bmi1 mostraron una ligera transformación posterior del esqueleto axial a 11.5 y 12.5 días del desarrollo embrionario. Estos hechos se correspondieron con una desregulación del patrón de expresión de parte de los genes Hox (van der Lugt et al., 1996). Además de estas malformaciones esqueléticas, los ratones Bmi1^{-/-} mostraron defectos severos en los sistemas hematopoyético y neuronal (Molofsky et al., 2003; Park et al., 2003). Inicialmente se pensó que estos defectos se deberían exclusivamente a un incremento en la apoptosis causada por la activación de la ruta de p53 mediada por altos niveles de p19 (Jacobs et al., 1999b). Sin embargo, trabajos más recientes han demostrado que se produce un dramático impedimento en la capacidad de auto-mantenimiento (Molofsky et al., 2003; Park et al., 2003) de estas poblaciones de células madre. El efecto está mediado, además de por un incremento

en la expresión de p16 y p19, por una desregulación de muchos genes, incluyendo miembros de la familia Hox, como consecuencia de la depleción de Bmi1 (Molofsky et al., 2003).

Papel de Bmi1 en la biología de células madre adultas

Bmi1 representa un factor de transcripción clave, no sólo para la definición de las células madre hematopoyéticas (HSCs) y neurales adultas (NSCs) (Lessard & Sauvageau, 2003; Molofsky et al., 2003; Park et al., 2003) sino también para una amplia variedad de compartimentos de células madre de distintos órganos. Bmi1 es el encargado de regular la capacidad de auto-mantenimiento y de preservar las características intrínsecas de una célula madre.

Las **células madre hematopoyéticas** constituyen uno de los linajes de células madre mejor estudiados y caracterizados. Estas células son capaces de dar lugar a todos los tipos celulares de la sangre. Ratones adultos Bmi1^{-/-} mostraron una reducción drástica en el número de HSCs además de, una incapacidad para auto-renovarse. Sin embargo no se observó tal efecto en las HSCs obtenidas del hígado fetal de ratones *knock-out* para Bmi1, enfatizando la relevancia de este miembro de PCR1 en el mantenimiento de las células madre de organismos adultos. Recientemente se ha demostrado que la represión de Bmi1 induce la expresión aberrante de dos genes implicados en el desarrollo: Ebf1 y Pax5 en las HSCs, promoviendo una especificación temprana del linaje hematopoyético (Oguro et al., 2010).

Otra de las poblaciones donde Bmi1 es requerido para su auto-renovación es en las **células madre neurales** adultas localizadas en la zona subventricular (Molofsky et al., 2003). A nivel molecular, la pérdida de la capacidad de auto-mantenimiento de las NSCs tras la delección de Bmi1 es predominantemente atribuida a una re-expresión del locus Ink4a/Arf (Bruggeman et al., 2005). Bmi1 mantiene la capacidad de auto-renovación en las NSCs mediante la cooperación con el factor de transcripción Foxg1 para reprimir la expresión de p21 (Fasano et al., 2009).

Además de la relevancia de Bmi1 en estos dos compartimentos, poco a poco se ha ido demostrando su relevancia en otras poblaciones de células madre.

Así pues, Bmi1 marca una población específica de **células madre intestinal (ISCs)**, ubicadas en la base de la cripta intestinal. La ablación específica de estas células Bmi1⁺ conlleva a una pérdida completa de la cripta donde se encuentran alojadas (Sangiorgi & Capecchi, 2008). Curiosamente, hay pruebas de que las células de la cripta Bmi1⁺ no proliferan activamente y que mayoritariamente podrían constituir un reservorio a largo plazo de células madre intestinales necesarias para la reparación del tejido en lugar de ser las encargadas de la homeostasis intestinal diaria (Tian et al., 2011). La homeostasis diaria del epitelio intestinal correría a cargo de un segundo grupo de ISCs que proliferan continuamente y se encuentran en contacto directo con las

células Paneth diferenciadas que actuarían como un nicho en la base de la cripta. Este segundo grupo de células madre expresan altos niveles del receptor de membrana Lgr5, pero niveles más bajos de Bmi1 (Barker et al., 2007; Sato et al., 2009; Yan et al., 2012).

Posteriormente, y usando también un sistema de trazado de linaje, se descubrió que Bmi1 estaba definiendo una subpoblación de **células acinares del páncreas** adulto con capacidad de auto-mantenimiento. Experimentos de pulso y caza con BrdU sugirieron que una parte de esta población retenía la marca del análogo de la timidina y por tanto no estaría continuamente replicándose (Sangiorgi & Capecchi, 2009).

Luckas y cols. demostraron la importancia de Bmi1 en el mantenimiento de las **células madre prostáticas**. A través de modelos de ganancia y pérdida de función de la proteína los autores observaron que Bmi1 era clave para mantener la potencialidad de este tipo celular *in vitro*. Con modelos de regeneración demostraron que, además, este gen era importante para la regeneración de la próstata (Lukacs et al., 2010).

Recientemente, Biehs y cols. han determinado que Bmi1 se expresa en las **células madre de los incisivos** y que su delección lleva a una reducción en el número de células madre, a la alteración de la expresión génica de estas células y a una reducción en la producción de esmalte (Biehs et al., 2013). En este modelo, Bmi1 se encarga de la represión de un número determinado de genes Hox, los cuales están preservando el estado indiferenciado de las células; cuando Bmi1 es inactivado son regulados al alza. Estos resultados sugieren que se requiere a represión de los genes Hox a través de Bmi1 para el mantenimiento de las células madre de los incisivos.

Por otro lado, en la **glándula mamaria**, la pérdida de Bmi1 no afecta de manera significativa al número de células madre pero compromete profundamente su función, produciendo un defecto en el crecimiento de la glándula (Pietersen et al., 2008).

Recientemente se ha identificado una población celular Bmi1+ en el **epitelio de la lengua de roedores** encargada de mantener el epitelio queratinizado del órgano a lo largo del tiempo y regenerarlo tras un daño. Usando un trazado de linaje, los autores describen que este tipo celular sería unipotente, encargado exclusivamente de la renovación del epitelio lingual pero no de las papilas gustativas. Estas células Bmi1+ serían células de división lenta, quiescentes, que entrarían en ciclo celular ocasionalmente bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, cuando el animal es irradiado para generar un modelo de daño, estas células proliferan rápidamente y se encargan de la regeneración del tejido epitelial (Tanaka et al., 2013).

En el pulmón hay una población con propiedades de célula madre denominadas **células madre bronquioalveolares** (BASCs) que son capaces de generar las células epiteliales no ciliadas del tracto respiratorio (células Clara) así como las células secretoras del espacio alveolar. Bmi1 es requerido para el auto-mantenimiento de estas células. Las BASCs deficientes para Bmi1 muestran una incapacidad para auto-mantenerse. Además, el *knock-out* de Bmi1 presenta una inhabilidad para producir células Clara tras inducir daño pulmonar, debido mayormente a una incapacidad para expandirse *in vivo* debido a la ausencia del gen (Zacharek et al., 2011).

Todos estos trabajos demuestran la función clave de Bmi1 en la identificación, caracterización, identidad y funcionamiento de las células madre más primitivas de los órganos adultos. Bmi1 no está necesariamente vinculado con células madre que proliferan continuamente sino más bien con la habilidad de poder mantener la potencialidad de la célula independientemente de su impacto en la proliferación celular. Esta idea es apoyada por el hecho de que, además de reprimir el locus Ink4/Arf, Bmi1 también controla las propiedades adhesivas de las células madre adultas regulando las interacciones con su matriz extracelular (Bruggeman et al., 2009).

Bmi1, por tanto, se postula como el marcador mejor establecido de células madre adultas.

OBJETIVOS

- 1. Identificación y caracterización de una población de células Bmi1+ en el corazón adulto del ratón.**
- 2. Trazado de linaje de las células cardíacas Bmi1+. Implicación en la renovación de los cardiomiocitos durante la homeostasis del órgano.**
- 3. Respuesta de las células Bmi1+ frente a un daño cardíaco. Contribución en la regeneración del corazón.**

MATERIALES Y MÉTODOS

MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA EL CULTIVO DE LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES

En las siguientes tablas se detalla la composición de los medios utilizados en el cultivo y expansión de los distintos tipos celulares

➤ Células cardíacas Bmi1+ y Sca-1+

Reactivo	Compañía	Concentración de uso
IMDM	Invitrogen	-
Suero bovino fetal-ES Cell	Gibco	10%
LIF	Millipore	10 ³ unidades
EGF	Sigma	10 ng/ml
FGF	Prepotech	20 ng/ml
L-Glutamina	Invitrogen	2 mM
Penicilina	Invitrogen	100 unidades/ml
Streptomicina	Invitrogen	100 unidades/ml

➤ Cardiomiocitos neonatales de rata

- Medio de pre-plaqueo

Reactivo	Compañía	Concentración de uso
DMEM	Invitrogen	-
Suero bovino fetal	Sigma	10%
L-Glutamina	Invitrogen	2 mM
Penicilina	Invitrogen	100 unidades/ml
Streptomicina	Invitrogen	100 unidades/ml

- Medio de cultivo

Reactivo	Compañía	Concentración de uso
DMEM	Invitrogen	75%
M-199	Sigma	25%
Suero de caballo	Sigma	10%
Suero bovino fetal	Sigma	5%
L-Glutamina	Invitrogen	2 mM
Penicilina	Invitrogen	100 unidades/ml
Streptomicina	Invitrogen	100 unidades/ml
α-D-arabinofuranosido	Sigma	1 µg/ml

➤ **Cardiomiocitos adultos de ratón**

• **Medio de pre-plaqueo**

Reactivo	Casa comercial	Concentración de uso
Medio 199 Hanks & Hepes	Invitrogen	-
Suero bovino fetal	Sigma	0.5%
Bicarbonato sódico	Sigma	22 mM
Albúmina de suero bovino	Sigma	0.2%
2,3-butanodionaminoxime	Sigma	10 mM
ITS	Sigma	0.001X
Bleblastatina	Sigma	25 µM
Penicilina	Invitrogen	100 unidades/ml
Streptomycin	Invitrogen	100 unidades/ml

• **Medio de cultivo**

Reactivo	Casa comercial	Concentración de uso
Medio 199 Hanks & Hepes	Invitrogen	-
Suero bovino fetal	Sigma	0.2%
Bicarbonato sódico	Sigma	22 mM
Albúmina de suero bovino	Sigma	0.2%
2,3-butanodionaminoxime	Sigma	10 mM
ITS	Sigma	0.001X
Bleblastatina	Sigma	25 µM
Penicilina	Invitrogen	100 unidades/ml
Streptomycin	Invitrogen	100 unidades/ml

➤ **Medio de cultivo de los explantes cardíacos**

Reactivo	Compañía	Concentración de uso
IMDM	Invitrogen	-
Suero bovino fetal	Hyclone	20%
L-Glutamina	Invitrogen	2 mM
Penicilina	Invitrogen	100 unidades/ml
Streptomycin	Invitrogen	100 unidades/ml

TAMPONES EMPLEADOS

➤ Tampón empleado en citometría y en el FACS

Reactivo	Compañía	Concentración de uso
HBSS	Invitrogen	-
Suero bovino fetal	Sigma	5%
EDTA	-	0.5 mM
Hepes	-	25 mM
Streptomicina	Invitrogen	100 unidades/ml
Penicilina	Invitrogen	100 unidades/ml

➤ Tampones empleados en el aislamiento de cardiomiocitos adultos

- Tampón de perfusión

Reactivo	Casa comercial	Concentración
Agua destilada	-	-
Cloruro sódico	Sigma	113 mM
Cloruro potásico	Sigma	4.7 mM
Fosfato potásico monobásico	Sigma	0.6 mM
Fosfato sódico dibásico	Sigma	0.6 mM
Sulfato magnésico heptahidratado	Sigma	1.2 mM
Bicarbonato sódico	Sigma	12 mM
Bicarbonato potásico	Sigma	10 mM
Rojo fenol	Sigma	0.032 mM
HEPES	Sigma	10 mM
Taurina	Sigma	30 mM
2,3-butanodionamonoóxido	Sigma	10 mM
Glucosa monohidrato	Sigma	5.5 mM

➤ Tampones empleados en Inmunohistoquímica

- Tampón PHEM

Reactivo	Compañía	Concentración de uso
Hepes	-	25 mM
EGTA	Sigma	10 mM
PIPES	Sigma	60 mM
Cloruro de Magnesio	-	2 mM

- **Tampón de Bloqueo (BB)**

Reactivo	Compañía	Concentración de uso
PHEM	-	-
Gelatina	Sigma	0.5%
Albúmina de suero bovino	Sigma	0.1%
Tween-20	Sigma	0.1%

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: modelos animales y tamoxifeno.

En el transcurso de esta tesis se han utilizado modelos animales de ratón que han sido mantenidos en condiciones estándar: aire filtrado HEPA, temperatura estable a 22°C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y comida y agua *ad libitum*, previamente esterilizadas por radiación. La presencia de patógenos se ha controlado de manera rutinaria (condiciones SPF, *Specific Pathogen Free*).

Los protocolos de experimentación animal y su manejo (cuidado y sacrificio) se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación española (Real Decreto 223/88 y Orden Ministerial 13-10-89 del Ministerio de agricultura, Pesca y Alimentación para la protección de animales de laboratorio) y con la convención europea (ETS-123) sobre la protección de mamíferos vertebrados usados en investigación.

Los modelos animales de ratón empleados en los experimentos de este trabajo se corresponden con la cepa C57B/L6 obtenidas de los laboratorios Jackson (Estados Unidos), Charles Rivers (Estados Unidos) y Harlan (Reino Unido).

La mayor parte de esta tesis se ha basado en el uso de la línea transgénica BmiCreER obtenida a través de la colaboración con el Dr. Mario Capecchi, el creador de la línea (Sangiorgi & Capecchi, 2008). Como modelo reportero se utilizó la línea Rosa26YFP. Los animales bitransgénicos Bmi1^{CreER/+};Rosa26^{YFP/+} (Bmi1-YFP) se obtuvieron cruzando la línea Bmi1CreER con la línea reportera Rosa26YFP. Los animales adultos (desde 6 hasta 144 semanas de edad) doble heterocigotos Bmi1-YFP fueron inducidos con tamoxifeno (Sigma) disuelto en aceite de maíz (Sigma) a una concentración final de 20 mg/ml. El tamoxifeno fue inoculado intraperitonealmente mediante tres inyecciones consecutivas cada 24 horas (9 mg por cada 40 g de peso) y los órganos analizados en el día indicado tras la última inyección. Para la inducción de los embriones, el tamoxifeno fue inoculado a las madres gestantes también intraperitonealmente los días de gestación 17.5 y 18.5.

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE DISTINTOS TIPOS CELULARES

Células cardíacas Bmi1+ y Sca-1+

Para el aislamiento de poblaciones purificadas del corazón se realizó un protocolo basado en una digestión enzimática y una posterior fragmentación mecánica de los fragmentos digeridos. Ambas poblaciones se obtuvieron de animales Bmi1-YFP a los que se anestesió con un cóctel de Ketamina/Xilacina (Merial/Bayer) más la administración de heparina (Chiesi) para evitar una coagulación sanguínea. El protocolo de obtención del corazón se llevó a cabo perfundiendo manualmente el corazón con PBS a 4 °C a través de la aorta y de la vena cava inferior derecha para eliminar los restos de sangre alojados, tanto en las cavidades cardíacas, como en el sistema coronario. Una vez eliminada la sangre, se escindió el corazón y se troceó en fragmentos de 1 mm², los cuales fueron digeridos con colagenasa IV 0.1% (Invitrogen) y 10 µg/ml DNAsa (Roche) en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma) durante 40 min a 37°C. Se consiguió una suspensión celular homogénea mediante suave pipeteo mecánico que se filtró posteriormente por una malla de 70 µm (BD Biosciences) y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min.

Cardiomiocitos neonatales de rata

Para la obtención de cardiomiocitos neonatales de rata se emplearon crías de rata Wistar de entre 1 y 4 días de edad siguiendo el protocolo descrito previamente (Toraason & Breitenstein, 1988). Brevemente, los corazones de las ratas neonatas fueron lavados con HBSS (Sigma) y troceados en fragmentos de 1 mm². Los fragmentos se digirieron a 37 °C durante 40 minutos con tripsina (Invitrogen) al 0.05% en HBSS. Para parar la acción enzimática de la tripsina, se añadió suero y se centrifugó la muestra a 1200 rpm durante 5 minutos. Eliminado el sobrenadante, los fragmentos de los corazones fueron digeridos con colagenasa 0.1% (clase II, Worthington) en HBSS a 37 °C durante 40 min, disuelta a una concentración de 4 mg/ml en medio L15 (Sigma). Para conseguir una suspensión homogénea de la muestra, ésta se pipeteó suavemente unas 20-30 veces para favorecer la disgregación mecánica del tejido. Posteriormente, la muestra fue filtrada en una malla de 70 µm (BD Biosciences) y la suspensión homogénea plaqueada en botellas de 175 cm² (1 botella por cada 4 corazones) durante 2 horas a 37 °C 21% O₂ y 5% CO₂ en el medio de pre-plaqueo con el objetivo de seleccionar la fracción cardiomiocítica (no se adhiere al plástico de la botella). Los cardiomiocitos recogidos en el sobrenadante fueron centrifugados a 1200 rpm durante 5 min y sembrados en placas, previamente recubiertas por una combinación de gelatina 0.1% (Sigma) y fibronectina 4 µg/ml, (BD Biosciences) durante al menos 1 h a 37 °C en el medio de cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata.

Cardiomiocitos adultos de ratón

Los cardiomiocitos adultos fueron aislados de los corazones de ratones Bmi1-YFP desde las 6 hasta las 144 semanas de edad. Para evitar la formación de coágulos sanguíneos en el corazón, los ratones fueron inyectados con heparina (Chiesi) y eutanasiados por dislocación cervical. Se eliminó la piel y se abrió el peritoneo desde la cavidad abdominal hasta la garganta. Seguidamente se cortó el diafragma y las costillas a los dos lados de la cavidad torácica, exponiendo el corazón. Bajo la lupa se extrajeron el pericardio y los dos lóbulos que forman el timo, exponiendo el callado aórtico. Alrededor de la base de la aorta se dispuso un hilo de sutura quirúrgica al que se le hizo un nudo sin llegar a estrecharlo. A continuación, se realizó un pequeño corte en la primera bifurcación de la aorta, en el punto de unión de la arteria braquicéfala y la carótida común izquierda. Por el orificio generado se introdujo una cánula (BD Instyle Autoguard) sin llegar a atravesar la válvula aórtica, y se fijó con el hilo de sutura mediante un nudo. A partir de aquí, el corazón fue extraído de la cavidad corporal junto con la cánula y ésta fue conectada a un sistema de perfusión retrógrado bajo presión constante (60 mmHg) a 37 °C durante 5 min con la solución de perfusión libre de calcio. La digestión enzimática se realizó mediante la adición de 0,2 mg/ml de la enzima Liberasa (Roche), formada por un cóctel de collagenasas y proteasas, tripsina 0,14 mg/ml (Invitrogen) y 12,5 μ M CaCl_2 a la solución de perfusión durante 10 min a 37°C. Se puede percibir el grado de digestión del órgano por su aspecto flácido y pálido. A continuación el corazón se retiró del sistema de perfusión y se disgregó hasta obtener una suspensión celular homogénea empleando pipetas Pasteur de plástico con diferentes aberturas de tamaño (2, 1.5 y 1 mm de diámetro). El buffer de digestión fue neutralizado con otro medio tampón compuesto por el tampón de perfusión más 10% de suero bovino fetal (Invitrogen) y 12.5 μ M CaCl_2 . Después de que los cardiomiocitos cayeran por gravedad durante 30-40 min, el sobrenadante fue aspirado y los cardiomiocitos se resuspendieron en la solución de perfusión mas 5% suero bovino fetal (Sigma) y 12,5 μ M CaCl_2 . Las concentraciones de calcio aumentaron gradualmente, de 62 μ M a 1 mM CaCl_2 . Tras varias fases de decantación, las células fueron sembradas en placas, pre-cubiertas con 0,5 g/ml con laminina (BD Biosciences) en PBS durante 1-2 h a temperatura ambiente, en el medio de pre-plaqueo de los cardiomiocitos. Después de 2 h, los cardiomiocitos fueron fijaron con 2% PFA (USB) o empleados para los estudios del estudio de las corrientes de calcio *in vitro*, para lo cual se realizó un cambio de medio: se añadió su medio de cultivo.

CULTIVO DE EXPLANTES DE CORAZÓN ADULTO

Con el objetivo de realizar el cultivo de explantes de corazón adulto, se siguió un protocolo previamente descrito (Messina et al., 2004) con ligeras modificaciones. Para el cultivo de explantes se emplearon animales Bmi1-YFP de 6-8 semanas de edad, previamente inducidos con TM. Se extrajeron los corazones tras haber sido perfundidos con PBS y se cortaron en pequeños fragmentos ($<2\text{ mm}^2$). Estos fragmentos se sometieron a una digestión de colagenasa IV (0.1%, Invitrogen) en HBSS a 37 °C durante 5 min. Los fragmentos se sembraron en placas recubiertas con gelatina al 0.1% (Sigma) en el medio de explantes, en un incubador a 37 °C, 21% O₂ y 5% de CO₂. Al cabo de varios días, de los fragmentos de corazón emergieron células de tipo estromal que fueron formando una capa sobre la cual, al cabo de varios días, apareció otro tipo celular de morfología redondeada y aspecto brillante. Cuando este tipo celular fue detectado, el cultivo se fijó con PFA (USB) al 2%, en frío para analizar por inmunocitoquímica la naturaleza de estas células pequeñas y brillantes.

ENSAYO DE CARDIOSFERAS

Para el ensayo de cardiosferas, células Bmi1+ y Sca-1+Bmi1- fueron sorteadas de corazones de animales Bmi1^{CreER/+};Rosa26^{YFP/+} de 6-8 semanas de edad, previamente inducidos con TM. Los corazones fueron perfundidos con PBS antes de su escisión y digeridos con colagenasa IV (0.1%, Invitrogen) y 10 µg/ml DNAsa (Roche). Una vez sorteadas, las células se sembraron en placas de 35 mm² previamente recubiertas con gelatina 0.1% (Sigma) y tras un pase, se sembraron 2×10^5 células de cada tipo celular en pocillos de 35 mm² de ultra baja adherencia para favorecer la formación de cardiosferas (Corning) en su medio de cultivo. Tras dos días, las cardiosferas fueron recogidas en medio sin suero y centrifugas a 1000 rpm durante 1 min sobre un colchón de suero bovino fetal (Sigma) para decantar exclusivamente las cardiosferas y no la suspensión monocelular. Tras eliminar el sobrenadante, las cardiosferas se resuspendieron en PBS para realizar fotos bajo la lupa (Leica MZ16FA motorizada) acoplada a una cámara Leica DFC310 FX. Las cardiosferas fueron contadas y sus áreas estimadas usando el programa IMARIS 7.3.1 (Bitplane).

DIFERENCIACIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES

- **Diferenciación endotelial y vascular**

Para la diferenciación endotelial, se estudió la capacidad espontánea de las células en un modelo de confluencia celular en su medio de cultivo. Una vez sorteadas, tanto las células Bmi1+(YFP+) como las Sca-1+Bmi1-(YFP-)CD45- se sembraron sobre cristalitos de 12 mm² en una placa de 24 pocillos, previamente recubiertos por gelatina 1% (Sigma) durante 1 h a 37 °C a una densidad de

5×10^3 células/pocillo en su medio de cultivo. Cuando el cultivo llegó a la confluencia, aparecieron estructuras complejas tubulares con un núcleo central, tras 7-15 días de cultivo. Las células fueron fijadas con PFA (USB) al 2% en frío durante 15 min y se analizaron marcadores específicos de diferenciación endotelial y vascular mediante técnicas de inmunofluorescencia.

- **Diferenciación cardíaca**

Para evaluar la diferenciación cardíaca de las células Bmi1+ se realizaron co-cultivos con cardiomiocitos neonatales de rata. Para ello se aislaron los cardiomiocitos como se ha descrito anteriormente y se sembraron a una densidad de 7.5×10^4 células/cm² en pocillos de placas de 24 pocillos, con su medio de cultivo. Al siguiente día se cambió el medio y se mantuvieron durante 72 horas con medio fresco. Pasado ese tiempo se sembraron en la misma placa cardiosferas de células Bmi1+ crecidas en placas de baja adherencia (Corning) (\approx 10 cardiosferas por pocillo) con el medio de cultivo de los cardiomiocitos, pero sin el suplemento de la citosina arabinofuranosa. El desarrollo del cultivo se monitorizó bajo la lupa con el fin de detectar las diferenciaciones de las células YFP+, fijándolas con 2% PFA (USB) en frío, 7-10 días después para el análisis de marcadores cardíacos por inmunofluorescencia.

ENSAYO DE CALCIO EN CARDIOMIOCITOS ADULTOS

Con el fin de detectar los CM YFP+ sin la necesidad de usar técnicas de inmunofluorescencia, a las 2 h de ser plaqueados fueron localizados con el microscopio confocal LSM 780 equipado con un objetivo de inmersión W 20 X Plan-APOCHROMAT (apertura numérica de 1.0). La fluorescencia de los CM YFP+ fue detectada con el láser 514 nm, que excita específicamente la proteína fluorescente YFP mientras que se empleó un detector de luz transmitida para localizar a todos los CM en general. De esa manera con este detector se localizaron las células cardíacas y con el láser 514 nm se localizaron los CM YFP+. Se capturaron las coordenadas de aquellas localizaciones donde hubiera cardiomiocitos YFP+ y YFP- para poder comparar la incorporación de calcio en ambas sub-poblaciones. Para el estudio del calcio se empleó el marcador Fluo-4 AM (Invitrogen), preparado a una concentración stock de 1 mM en una solución 1:1 en DMSO (Invitrogen) y 20% de Plurónico F-127. La concentración de trabajo del Fluo-4 fue 1 μ M. El Fluo-4 se añadió al medio compuesto por DMEM (Sigma) suplementado con 100 unidades/ml de Penicilina (Invitrogen), 100 mg/ml de Streptomycin (Invitrogen) y 2 mM de L-Glutamina (Invitrogen). Las células fueron incubadas en oscuridad durante 20-30 min. Luego se lavó el cultivo con mucha suavidad con medio sin Fluo-4 y posteriormente se añadió medio fresco sin rojo fenol. El Fluo-4 se excitó con el láser de argón 488nm y la señal de emisión se recogió en el canal de 505. Las imágenes fueron capturadas durante el tiempo (xyT, profundidad de pixel 1.58us) para un análisis posterior.

CITOMETRIA DE FLUJO Y SEPARACIÓN CELULAR

- **Citometría de flujo**

Para el análisis de los diferentes marcadores de superficie (recogidos en Tabla 1, mostrada más abajo) los corazones de animales Bmi1-YFP inducidos con TM, de edades comprendidas entre las 6 y 144 semanas fueron escindidos tras ser perfundidos con PBS. Los corazones fueron digeridos con 0.1% colagenasa IV (Sigma) y 10 µg/ml DNAsa (Roche) durante 40 min a 37 °C. Se homogeneizó la muestra mediante suave pipeteo mecánico y posteriormente se filtró en una malla de 40 µm (BD Biosciences) con el fin de eliminar los desechos celulares. La suspensión celular se centrifugó a 1300 rpm durante 10 min y el pellet se resuspendió en el tampón de citometría. Para el marcaje, las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios, marcados directamente con el fluorocromo, o con bitonina durante 15 min a 4°C en el tampón de citometría. A continuación se añadió 1-2 ml de tampón para lavar el exceso de anticuerpo y se centrifugó a 1300 rpm durante 10 min a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en el tampón de citometría conteniendo el anticuerpo secundario requerido en su caso (recogidos en la Tabla 1 mostrada más abajo).

Para los experimentos de citometría se empleó el citómetro BD FACS Canto II equipado con un láser 488 nm que fue empleado para excitar la molécula YFP (recogida en el canal 525/50). Con el fin de discriminar las células YFP+ de la autofluorescencia, se empleó el láser 488 para excitar las células pero recogiendo la longitud de onda en el canal 585 (PE; ficoeritrina).

El análisis de los cardiomiocitos adultos se llevó a cabo empleando el analizador BD LSR Fortessa usando un filtro de densidad neutral 1 OD. Tras el último paso de decantación por gravedad, los cardiomiocitos fueron teñidos con DAPI (Invitrogen) con el fin de poder detectar las células vivas. El láser empleado para detectar y el estimar el porcentaje de cardiomiocitos YFP+ fue el 488. De nuevo, para discriminar las células YFP+ de la autofluorescencia, se empleó el láser 488 para excitar las células pero recogiendo la longitud de onda en el canal 585 (ficoeritrina).

En cualquier caso, el análisis de los resultados obtenidos en los citómetro de flujo se llevó a cabo empleando el software FACS DIVA.

Anticuerpo	Casa comercial	Especie	Dilución
Sca-1-APC	BD Pharmingen	Rata	1:100
Sca-1-biotinilado	BD Pharmingen	Rata	1:100
C-kit-APC	BD Pharmingen	Rata	1:100
Cd45-biotinilado	BD Pharmingen	Rata	1:100
Cd45-405	BD Pharmingen	Rata	1:100
Cd90-APC	BD Pharmingen	Rata	1:100
Cd31-biotinilado	BD Pharmingen	Rata	1:100
Streptavidina Alexa Fluor 405	Invitrogen	-	1:100

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios usados para citometría de flujo. Listado de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en citometría de flujo. Abreviaturas: APC, alofococianina.

- **Separación celular: FACS Y MACS**

En este trabajo se han utilizado varias técnicas de separación celular según la aplicación. La técnica FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) fue empleada para aislar las poblaciones Bmi1+(YFP+) y la Sca-1+Bmi1-(YFP-) mediante la fluorescencia YFP y anticuerpos específicos (Sca-1, recogido en la Tabla 1). Por otro lado la técnica MACS (*Magnetic activated cell sorting*) se utilizó esporádicamente para aislar la población Sca-1, pero en cualquier caso (tanto si las células Sca-1+ eran separadas por FACS o MACS) para eliminar su fracción hematopoyética.

FACS (Fluorescence activated cell sorting)

Las células YFP+ se separaron del total de la suspensión celular gracias al sorter BD FACS Aria II Special Order System equipado con los láseres descritos en el apartado de citometría. Para separar las células Sca-1+ de la misma suspensión celular, ésta se incubó con el anticuerpo Sca-1 marcado con el fluorocromo APC y a continuación se separó (se excita con un láser 639, rojo y se detecta en un detector al 660/20). Por tanto de los mismos corazones se separó la fracción Bmi1-(YFP+) y la fracción Sca-1+Bmi1-(YFP-) cuando fue necesario. En ambos casos las células fueron regidas del *sorting* en suero bovino fetal (Sigma) y posteriormente centrifugadas a 1300 rpm durante 10 min. Las células fueron sembradas en plástico previamente recubierto con gelatina al 0.1% (Sigma) durante 1 h a 37 °C, con su medio de cultivo.

MACS (Magnetic-activated cell sorting)

En determinadas ocasiones se recurrió a la obtención de la fracción Sca-1+ mediante el MACS. El protocolo inicial de escisión y digestión del corazón fue el mismo que descrito anteriormente. Tras obtener la suspensión celular, ésta fue incubada con el anticuerpo biotinilado anti-Sca-1/Ly6a

(Abcam, 1:100) en el buffer de citometría seguido por el aislamiento de las células positivas para la expresión del marcador Sca-1 con Kappa Microbeads (Myltenyi Biotec).

La fracción de las células Sca-1+ obtenidas, tanto por el MACS como por el FACS, positivas para el linaje hematopoyético fueron descartadas mediante MACS gracias al *Lineage cell depletion kit* (Miltenyi Biotec)

RNaseq Y TRANSCRIPCIÓN REVERSA-REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (RT-qPCR)

Para el estudio del transcriptoma comparativo entre las células Bmi1+(YFP+) y Sca-1+Bmi1-(YFP-), se procedió, primeramente, a la extracción de los corazones de ratones Bmi1-YFP de 6-8 semanas de edad tras 5 días de la inducción con TM. Los corazones se digirieron con colagenasa IV (Invitrogen) y 10 µg/ml DNAsa (Roche). Las condiciones de separación celular mediante *sorting* fueron las descritas en el apartado anterior. Se sortearon un total de 24 corazones, divididos en 4 réplicas, cada una formada por las células procedentes de 6 corazones. Se obtuvieron 4×10^5 células Bmi1+ y Sca-1+Bmi1- por cada réplica. Este procedimiento se adoptó para la comparativa de ambas poblaciones en condiciones fisiológicas de homeostasis. El estudio del transcriptoma tras una situación de daño cardíaco (ligadura permanente de la coronaria izquierda) se llevó a cabo 5 días tras el daño coronario. Brevemente, los animales se indujeron con tamoxifeno a las 6-8 semanas de edad y tras 5 días se produjo la ligadura de la coronaria. Transcurridos 5 días del infarto, los corazones fueron perfundidos con PBS, digeridos con colagenasa IV (Invitrogen) y 10 µg/ml DNAsa (Roche) y ambas poblaciones fueron sorteadas. En esta condición se sortearon 9 animales divididos en 4 réplicas (2-3 animales por réplica). En ambas condiciones de estudio (tanto en condiciones fisiológicas como después del infarto), después del *sorting*, se procedió a la depleción de la fracción CD45+ de la población Sca-1+ mediante MACS, como se ha descrito anteriormente. Inmediatamente después del *sorting*, ambas poblaciones celulares fueron peleteadas a 1300 rpm durante 10 min a 4 °C. El ARN total se aisló con el kit de Arcturus Pico Pure (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). El cADN fue amplificado del ARN total (10-25 ng) utilizando el sistema de RNA-seq Ovation ® v2 (NuGEN ® Technologies, CA San Carlos). El cADN amplificado (1 µg) fue sonificado con un tamaño promedio de 200-300 pares de bases y utilizado con la preparación de muestras de DNA TruSeq v2 Kit (Illumina, San Diego CA) para generar las librerías de ADN. La distribución de la calidad y el tamaño de las librerías fue determinada mediante el Kit de ADN-1000 de Bioanalizador Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara CA) y cuantificado con el espectrofotómetro Nanoquant (Tecan Austria GmbH). Las librerías se aplicaron a una celda de flujo Illumina para la generación de *clusters* (True Seq SR Cluster Kit V2 cBot). Lecturas individuales de 75 bases fueron generados en el Genome Analyzer IIx utilizando el Kit de SBS TruSeq v5 (Illumina) siguiendo el protocolo estándar de la secuencia. Se adoptó el

Ingenuity Pathway Analysis (IPA) con el fin de integrar los datos obtenidos del RNAseq e identificar las cascadas de señalización plausibles a través de la generación de redes reguladoras mediante el software. Empleando la aplicación *Gene Ontology* (GO) se pudieron generar *heat maps* incluyendo en el análisis, aquellos genes que tenían una expresión diferencial significativa (p-valor <0.05) entre las células Bmi1+ y Sca-1+Bmi1- en condiciones de homeostasis o bien entre las células YFP+ en condiciones de homeostasis o tras un infarto de miocardio. El GO análisis de términos sobre y bajo representados se llevó a cabo con FatiGO: <http://babelomics3.bioinfo.cipf.es/FatiGO>.

Para la validación de algunos genes de interés obtenidos en el RNAseq relacionados con funciones de pluripotencia y diferenciación se sortearon suspensiones homogeneizadas procedentes de corazones de animales Bmi1-YFP tras 5 días de la inducción con TM. El protocolo de extracción y digestión de los corazones fue el mismo que el seguido en el estudio del transcriptoma. Tras el *sorting*, las células fueron centrifugadas y mediante el kit de *Cells to Ct* (Ambion) se obtuvo el cADN en un proceso directo basado en la lisis celular, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Los oligos utilizados en esta comprobación (recogidos en la Tabla 2, mostrada más adelante) fueron diseñados entre dos exones del gen para evitar la amplificación de la secuencia genómica en vez de la mensajera, para tener una temperatura de alineamiento de aproximadamente 60 °C y para generar unos fragmentos de aproximadamente 100 pares de bases, siendo adecuados para su uso en RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR). Se usó el kit comercial *Power SYBR-Green Master Mix* (Applied Biosystems). Como control de expresión de gene endógeno se utilizó, de manera general, la expresión del gen *Gusb*. La representación de la expresión relativa de los genes se calculó como $2^{(-\Delta Ct)}$, donde ΔCt es el valor normalizado frente a la expresión de *Gusb*. Las condiciones utilizadas para la reacción de la PCR cuantitativa se recogen en la Tabla 3.

Nombre del gen	Oligo sentido	Oligo antisentido
Bmi1	5'-CGCCCGCTCAGATCGCCTC-3'	5'-ACCCTCCACACAGGACACACATT-3'
Cd31	5'-AGTTCGCTGCCCATTCATCAC-3'	5'-ACCCTCCACACAGGACACACATT-3'
Oct-4	5'-TCTTCTGCTTCAGCAGCTTG-3'	5'-GTTGGAGAAGGTGGAACCAA-3'
Conexina 43	5'-GGACCTTGTCAGCAGCTT-3'	5'-TCCAAGGAGTTCACCACTT-3'
Troponina T2	5'-ACCCTCAGGCTCAGGTTCA-3'	5'-GTGTGCAGTCCCTGTTTCTAGA-3'
Tropomiosina	5'-TCCAACCTCCTCAACCAG-3'	5'-CTCCGAGGCTCTCAAAGATG-3'
Myh6	5'-ATCCCTCAAACGTGCAGGAG-3'	5'-AAGGTCAGCAGGAGCCAATC-3'

Tabla 2. Lista de oligos utilizados en reacciones de RT-qPCR

Fases	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Iniciación	95°C	10 min	1
Desnaturalización	95°C	15 s	40
Extensión	60°C	1 min	
Curva de Melting	95°C	15 s	1
	95°C	15 s	
	95°C	15 s	
Conservación	4°C	∞	-

Tabla 3. Protocolo de amplificación para RT-qPCR.

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Imunohistoquímica e Inmunocitoquímica

El tratamiento del corazón para la realización de la inmunohistoquímica se llevó a cabo como se había descrito previamente (Malliaras et al., 2013) con algunas modificaciones. Brevemente, los animales fueron heparinizados (Chiesi) y anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilacina (Merial/Bayer). Los corazones de animales Bmi1-YFP tras 5 días, 2, 6 y 12 meses de la inducción con TM, fueron perfundidos con PBS y posteriormente con PBS:OCT (Tisutek) en la proporción 1:1 con el fin de rellenar las cavidades cardíacas, así como el sistema coronario con OCT para evitar el colapso de las mismas al realizar los cortes histológicos. Una vez perfundido, el corazón se escindió y congeló en OCT empleando nieve carbónica para preservar el tejido lo más intacto posible. Los cortes transversales y/o longitudinales de los corazones se realizaron de 8 µm de grosor y posteriormente se guardaron a -80 °C para ser procesados.

El protocolo de inmunodetección para tejido incluyó la fijación de los cortes de corazón con 2% de PFA (USB) durante 25 min en frío. Posteriormente las secciones fueron lavadas con PHEM buffer e incubadas con tampón de bloqueo (BB) durante 10 min a temperatura ambiente. Para eliminar autofluorescencia emplearon Glicina (Merck) 150 mM y borohidruro sódico (Sigma) 1 mg/ml durante 10 min. Posteriormente los cortes se permeabilizaron con 0.1% de Tritón X-100 (Sigma) en BB. Las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes en BB (recogidos en Tabla 4, más adelante) durante 1-2 h a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 5 min con BB, los portos se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (recogidos en la Tabla 5, más adelante) en BB durante 45 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Finalmente los cortes fueron lavados 3 veces de 5 min con PHEM y 1 vez con PBS. Para la detección nuclear se optó por Sytox Green (Invitrogen) o *Prolong antifade*, con o sin Dapi (Invitrogen).

Todas las imágenes fueron capturadas por los microscopios confocales Leica SP5, Zeiss LSM 700 y LSM 780 acoplado con un laser de dos fotones Mai.Tai Spectra-Physics. Los programas

empleados para ensamblar las imágenes fueron el Image J y el ZEN. El procesamiento de las imágenes, incluyendo la asignación de pseudo-colores y cambios en el brillo y contraste se aplicaron uniformemente a lo largo de la totalidad de la imagen y se emplearon exclusivamente para ecualizar la apariencia de los paneles integrantes de imagen.

El protocolo para la inmunodetección en células se basó en la fijación de las células con PFA al 2% en frío durante 15-20 min para posteriormente ser lavadas con PBS 3 veces 5 min. A continuación se permeabilizaron con PBS-Tritón (Sigma) 0.5% durante 10 min y se bloqueó con PBS + albúmina de suero bovino (Sigma) 2%. durante 10 min. Los anticuerpos primarios y secundarios fueron incubados en este tampón de bloqueo.

Anticuerpo	Casa comercial	Especie	Dilución
Abcg2	Abcam	Rata	1:50
SαA	Sigma	Ratón	1:100
Bmi1	Abcam	Conejo	1:50
Bmi1	Millipore	Ratón	1:50
Cd31	Abcam	Rata	1:100
Cd31	BD Pharmingen	Rata	1:100
Conexina 43	Sigma	Conejo	1:100
GFP	Abcam	Pollo	1:100
GFP	Living colors	Conejo	1:100
Laminina	Abcam	Conejo	1:50
Sca-1	Abcam	Rata	1:100
Sca-1	R&D Systems	Rata	1:100
α-SMA	Sigma	Ratón	1:1000
Tropomiosina	Sigma	Ratón	1:100
Troponina T	Thermo Fisher	Ratón	1:100
VE-Cadherina	Santa Cruz	Cabra	1:25

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica e inmunocitoquímica. Lista de anticuerpos primarios empleados en las técnicas de inmunodetección. Abreviaturas: SαA, α-actinina sarcomérica.

Anticuerpo	Casa comercial	Especie	Dilución
Anti-ratón-A405	Molecular Probes	Cabra	1:100
Anti-rata-A405	Molecular Probes	Cabra	1:100
Anti-ratón-A647	Molecular Probes	Burro	1:500
Anti-rata-A647	Molecular Probes	Burro	1:500
Anti-conejo-A647	Molecular Probes	Cabra	1:500
Anti-ratón-Cy3	Jackson Immunoresearch	Burro	1:500
Anti-conejo-Cy3	Jackson Immunoresearch	Cabra	1:500
Anti-pollo-Cy3	Jackson Immunoresearch	Cabra	1:500

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunohistoquímica e inmunocitoquímica. Lista de anticuerpos secundarios empleados en las técnicas de inmunodetección. Abreviaturas: A405, Alexa Fluor 405; A647, Alexa Fluor 647; Cy3, cianina 3.

Hematoxilina/Eosina

Para realizar esta tinción se llevaron a cabo los pasos descritos en la Tabla 6. Al finalizar este proceso las muestras se montaron con D.P.X (Sigma).

Reactivo	Casa comercial	Incubación
Alcohol Acético (3%)	Sigma	1 minuto
Agua destilada	-	1 minuto
Hematoxilina de Harris	Sigma	1 minuto
Agua destilada	-	30 segundos
Ácido Alcohol (1%)	Sigma	2 segundos
Agua destilada	-	5 segundos
Eosina Alcohólica	Sigma	2.20 minutos
Agua destilada	-	5 segundos
Etanol 70%	-	5 segundos
Etanol 96%	-	5 segundos
Etanol absoluto	-	30 segundos
Xilol	-	2 minutos
DPX	Sigma	medio de montaje

Tabla 6. Pasos realizados en la tinción de Hematoxilina/Eosina.

MODELOS DE DAÑO CARDÍACO

Resección apical del corazón neonatal

Se llevó a cabo un modelo de daño neonatal basado en el trabajo descrito por Porrello y cols. donde los autores llevaron a cabo la resección del ápice del ventrículo derecho de animales neonatales de 1 día de vida (Porrello et al., 2011). En esta tesis, la resección apical se llevó a cabo en ratones Bmi1-YFP neonatales de un día de edad. Para este experimento, las madres preñadas fueron inducidas con TM los días 17.5 y 18.5 post coito (pc). Los neonatos de día 1 fueron anestesiados enfriándolos en una cama de hielo durante 4 min. El frío les provoca una apnea y bradicardia reversible cuando, posteriormente, son expuestos a temperaturas de 37 °C. Se llevó a cabo una incisión en la piel a nivel de la tercera y cuarta costilla para realizar un corte en los músculos intercostales de dichas costillas. Con el fin de separar la caja torácica y exponer el corazón, se emplearon unos separadores de 1mm (FST). A continuación se llevó a cabo un corte con unas tijeras de iridectomía en la parte apical del ventrículo derecho (<5%) hasta exponer la cámara ventricular. Posteriormente se usó hilo de sutura 7-0 no absorbible para cerrar la incisión entre las costillas. La piel se selló empleando un adhesivo específico para la piel (Vetbond, 3M). El grupo de animales control (*sham*) siguió los mismos pasos pero sin resección apical. Los animales se colocaron debajo de una lámpara con el fin de calentarlos durante unos minutos hasta que recuperaron la respiración y el latido normal.

Infarto agudo de miocardio en animales adultos

El modelo de daño cardíaco empleado en ratones adultos (6-8 semanas de edad) fue la ligación permanente de la arteria coronaria izquierda que promovió un infarto agudo de miocardio (IAM). Los animales a los que se les realizó el IAM fueron inicialmente inducidos con TM y a los 5 días se les realizó el IAM. Para llevar a cabo este procedimiento, los animales fueron anestesiados con 4% de sevoflorano y ventilados con aire y oxígeno en la proporción 1:1 usando un respirador de presión positiva (Minivent 845, Harvard con 160 pulsaciones/min y un volumen total de 250µl). Se realizó una toracotomía izquierda a través del cuarto espacio intercostal. Los pulmones fueron apartados para exponer el corazón, con la ayuda de separadores de 1.5 mm (FST). Tras retirar el pericardio, la coronaria anterior izquierda fue ligada a unos 2 mm por debajo del borde de la aurícula izquierda usando sutura de 7-0. La ligación fue considerada exitosa cuando la pared anterior del ventrículo izquierdo se volvió pálida, debido a la ausencia del aporte sanguíneo en esa zona del corazón, irrigada por la arteria coronaria. Los pulmones fueron hinchados aplicando una presión espiratoria positiva y las incisiones realizadas en el espacio intercostal y la piel se cerraron en capas con sutura 6-0. Tras la cirugía, los animales se mantuvieron en una manta eléctrica a 37 °C

hasta su recuperación. Los animales control (*sham*) fueron sometidos al mismo procedimiento pero sin la ligadura de la arteria coronaria.

ESTADÍSTICA

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa informático Prism 5.0 (Grahpad). Los tests estadísticos empleados en los distintos experimentos se encuentran detallados en los pies de figura. Un valor del P-valor <0.05 se consideró significativo. Todas las réplicas considerados en esta tesis han sido replicas biológicos.

RESULTADOS

1. Identificación y caracterización de una población de células Bmi1+ en el corazón adulto del ratón

1.1. Análisis de las líneas transgénicas empleadas.

Bmi1 es considerado como uno de los factores de transcripción más relevantes y clave para identificar y caracterizar las células madres adultas en diversos tejidos. ¿Tiene Bmi1 un papel en la biología de las células madre cardíacas? Bajo esta premisa se llevó a cabo un estudio de su expresión en corazón adulto de ratón. El modelo empleado para la detección de células Bmi1+ fue la línea transgénica *knock-in*, Bmi1IresCre, generada por el Dr. Mario Capecchi en el 2008 (Sangiorgi & Capecchi, 2008). En el último exón del gen Bmi1 se ha insertado la secuencia de la proteína recombinasa Cre fusionada al módulo de unión al ADN del receptor de estrógeno (RE) y precedida por una secuencia IRES, de tal manera que cuando se transcribe el gen Bmi1, también se transcribe la proteína de fusión Cre-RE, inactiva. La Cre sólo es activada cuando se administra tamoxifeno (TM). La unión del tamoxifeno al módulo RE, permite la entrada de la proteína de fusión al núcleo donde la recombinasa Cre ejerce su función (cortar el ADN en unas cortas secuencias target denominadas *LoxP*, y eliminarlo si dichas secuencias están en repetición directa). Dado que Bmi1 es un factor de transcripción, con el objetivo de hacer su expresión nuclear detectable para nosotros, se emplearon proteínas fluorescentes como elementos reporteros. El modelo reportero usado en este trabajo fue la proteína fluorescente amarilla (del inglés YFP) bajo el control del locus ubicuo Rosa26. La expresión de la YFP sólo se induce cuando la Cre escinde una región *stop* flanqueada por las secuencias *LoxP*, en repetición directa, que precede a la secuencia de la YFP. Se cruzó la línea Bmi1IresCre con la línea reportera Rosa26YFP. Tras la inducción con tamoxifeno, todas las células en el organismo que expresen Bmi1 expresan irreversiblemente la proteína YFP. Esto supone una ventaja ya que se puede detectar, mediante citometría de flujo o técnicas de inmunodetección, la expresión de un marcador nuclear mediante la expresión fluorescente de una proteína citoplásmica. Dado que la expresión de YFP es irreversible, podemos estudiar la evolución de la progenie de estas células mediante el seguimiento de la YFP y entender la contribución de este tipo celular en la homeostasis del órgano o incluso el papel que puedan desempeñar tras un daño cardíaco. La dosis de tamoxifeno óptima para la detección de la expresión de YFP en el corazón se administró en animales dobles heterocigotos Bmi1^{CreER/+};Rosa26^{YFP/+} (Bmi1-YFP) (Fig, 3A). Para ajustar la dosis, inicialmente, nos basamos en la publicación del Dr. Capecchi donde se describían diferentes aproximaciones para obtener una óptima expresión de YFP. Se evaluaron tres condiciones de inducción: a) 1 único pinchazo con TM y tras 5 días se analizó el corazón, b) 3 pinchazos espaciados cada 24 horas y al 5º día tras la última inducción se analizó la expresión de YFP y c) tres inducciones separadas 5 días, y tras 5 días del

último pinchazo se analizó la expresión de YFP (Fig, 3B). Como se aprecia en la figura 3C, una única dosis sólo fue capaz de inducir un pequeño porcentaje de células YFP+ de las detectadas cuando se les administraron 3 pinchazos a los animales. En las condiciones de tres dosis no se observó una diferencia significativa entre ambas por lo que se decidió adoptar el modelo de tres inducciones administradas cada 24 horas y al quinto día analizadas (Fig, 3C).

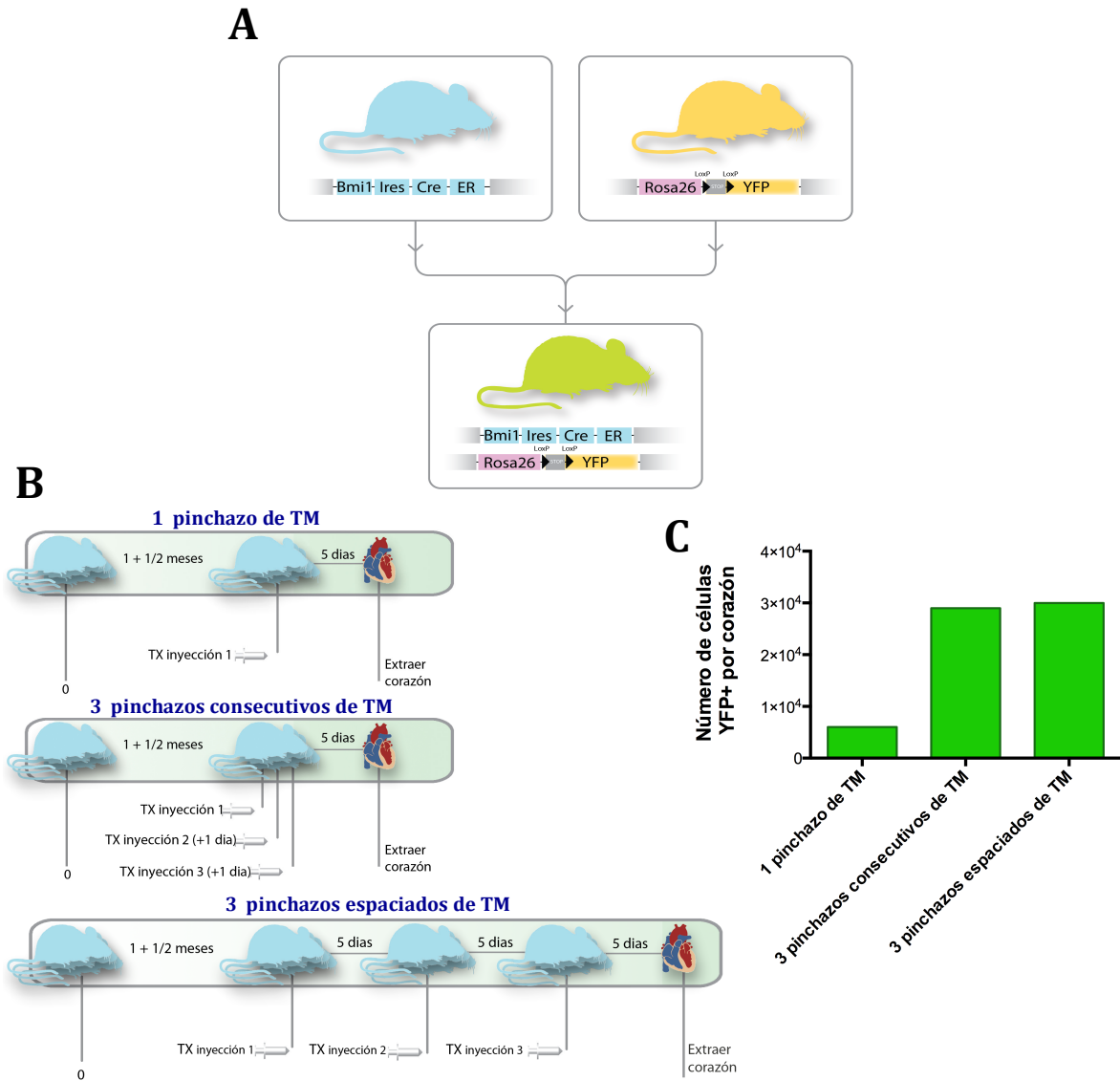


Figura 3. Descripción de los modelos transgénicos y dosis óptima de tamoxifeno empleados en este trabajo.

(A) Generación del ratón doble transgénico $Bmi1^{CreER/+}; Rosa26^{YFP/+}$ (Bmi1-YFP). (B) Esquema de los tres modelos utilizados para determinar la dosis óptima de inducción del tamoxifeno: a) 1 único pinchazo, b) 3 pinchazos consecutivos, espaciados cada 24 horas y c) 3 pinchazos espaciados cada 5 días. (C) Representación gráfica del número de células Bmi1+ (YFP+) obtenidas mediante la digestión enzimática del corazón y analizadas por citometría de flujo.

1.2. Expresión de Bmi1 en el corazón adulto de ratón

Con el fin de estudiar si la expresión de Bmi1 pudiera definir una población de células con propiedades de células madre en el corazón adulto, se indujeron animales Bmi1-YFP con TM, como se ha descrito anteriormente y 5 días después de la última inducción se obtuvieron los corazones. Para eliminar la sangre remanente, los corazones se lavaron con PBS y se digirieron con colagenasa. Tras obtener la suspensión homogeneizada no cardiomiocítica, ésta se analizó por citometría de flujo con el fin de detectar la fluorescencia emitida por la proteína YFP. En paralelo se llevaron controles negativos para descartar resultados que pudieran ser falsos positivos. Los controles negativos elegidos fueron animales Bmi1-YFP sin inducir con TM y animales Rosa26^{YFP/+} inducidos.

Como se muestra en la figura 4A, tras 5 días de la inducción con TM se pudo detectar un $2.7 \pm 0.2\%$ de células YFP+. Con el objetivo de descartar una posible recombinación espontánea en el modelo y, por tanto, la detección de la proteína YFP sin ser específica de la actividad inducible por TM, la fracción no cardiomiocítica de animales Bmi1-YFP sin inducir fue analizada por citometría. No se detectó expresión de YFP en animales no inducidos (Fig, 4A). De la misma manera, para garantizar que la proteína YFP solamente se expresa cuando la proteína Cre corta las secuencias *loxP* que flanquean la secuencia *STOP*, el compartimento no cardiomiocítico de animales Rosa26^{YFP/+} inducidos con TM fue analizado por citometría de flujo. Tampoco en este caso se detectó una población YFP+ (Fig, 4A). Ambas comprobaciones muestran la especificidad de la construcción transgénica empleada como modelo de estudio en esta tesis.

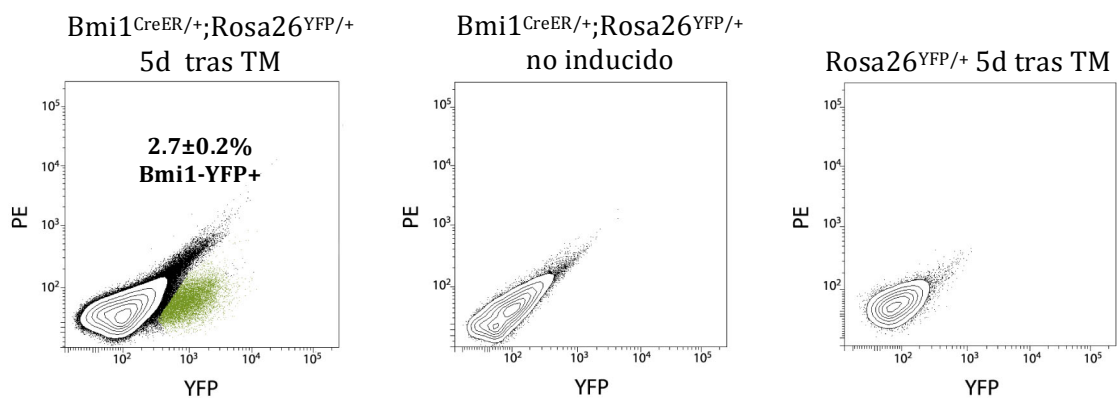
Un análisis superficial de machos y hembras reveló no haber diferencias importantes entre sexos, así como entre las cavidades del corazón en el número de células YFP+, aunque la región ventricular parecía albergar mayor porcentaje (Fig, 4B). Para este análisis se dividió el corazón en las 4 cavidades, las cuales fueron digeridas mediante colagenasa para analizar el número de células YFP+ en cada compartimento.

Como se ha comentado en el apartado de Introducción, Bmi1 juega un papel clave en el mantenimiento de las propiedades particulares de las células madre, expresándose por tanto, y específicamente, en dicho compartimento y por ende, ausente en las células diferenciadas. Para comprobar la presencia o ausencia de expresión de Bmi1 en los cardiomiocitos adultos, se indujeron animales Bmi1-YFP con TM y a los 5 días se obtuvo la fracción cardiomiocítica mediante el protocolo de digestión con Liberasa. En nuestro modelo transgénico, si los cardiomiocitos expresaran Bmi1, podríamos detectarlos por la co-expresión de la proteína YFP. Con ese fin, se llevó a cabo un análisis por citometría de flujo de la fracción cardiomiocítica. Se comprobó que la población de cardiomiocitos YFP+ en un corazón adulto de ratón a los 5 días tras

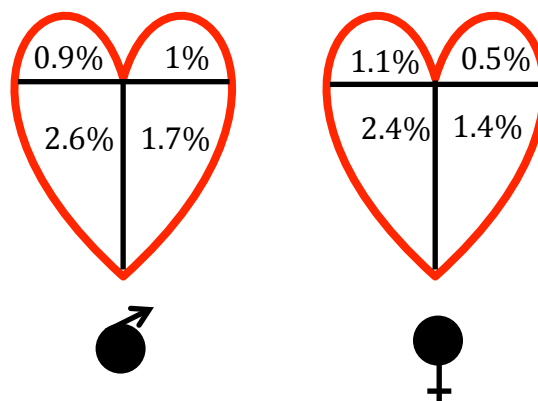
su inducción era prácticamente irrelevante: menos de 1 cardiomiocito YFP+ en 1.35×10^5 cardiomiocitos totales (Fig, 4C). Se llevaron a cabo los mismos controles negativos analizados para la fracción no cardiomiocítica: animales Bmi1-YFP sin inducir y animales Rosa26^{YFP/+} inducidos. En ninguno caso se encontraron cardiomiocitos YFP+ (Fig, 4C).

A

FRACCIÓN NO CARDIOMIOCÍTICA



B



C

FRACCIÓN CARDIOMIOCÍTICA

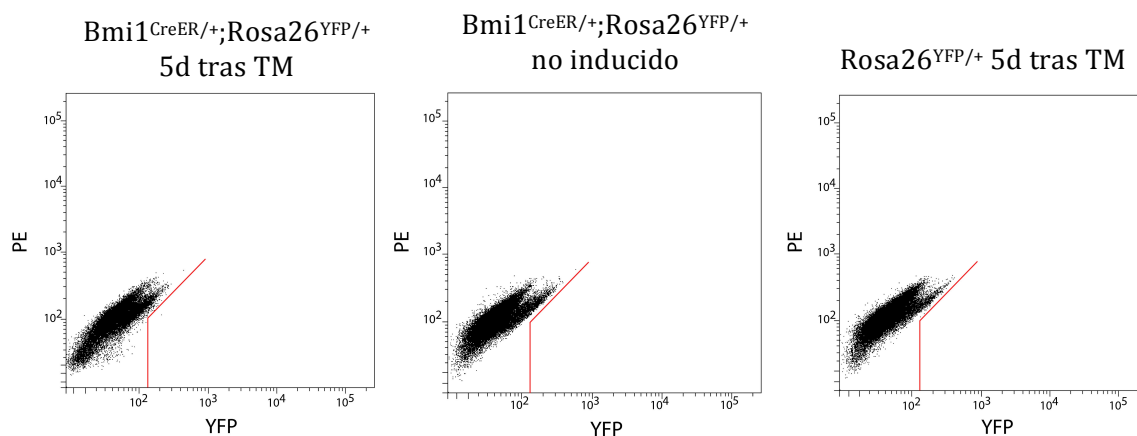


Figura 4. Expresión de Bmi1 en el corazón adulto de ratón.

(A) Detección de las células YFP+ en la fracción no cardiomiocítica en animales Bmi1-YFP tras cinco días de la inducción (n=21), animales Bmi1-YFP no inducidos (n=5) y animales heterocigotos para la construcción reportera tras cinco días de la inducción (n=2). (B) Porcentajes de las células YFP+ en las cuatro cavidades cardíacas en machos y hembras Bmi1-YFP tras cinco días de la inducción. (C) Citometría de flujo de los cardiomiocitos adultos aislados de corazones de animales Bmi1-YFP tras cinco días de la inducción (n=8), animales Bmi1-YFP no inducidos (n=3) y animales heterocigotos para la construcción reportera tras cinco días de la inducción (n=2).

PE: Ficoeritrina (del inglés, *phycoerythrin*).

1.3. Perfil de expresión de antígenos de superficie en la población Bmi1+

Con el fin de caracterizar el perfil de expresión de determinados marcadores de superficie en las células cardíacas Bmi1+ del corazón adulto, se optó por la selección de un panel de antígenos de superficie formado por c-kit, Sca-1, CD31 y CD45. Los genes c-kit y Sca-1 se han empleado para la caracterización de células progenitoras cardíacas mientras que otros se han considerado marcadores típicamente endoteliales (CD31) o hematopoyéticos (CD45).

Para el estudio de dichos marcadores, se consideró apropiado el análisis de su expresión en células Bmi1+ obtenidas directamente del corazón, sin ningún tipo de manipulación *ex vivo*. Tras 5 días de la inducción con tamoxifeno, los corazones de los animales Bmi1-YFP, se digirieron con colagenasa y la suspensión no cardiomiocítica fue analizada por citometría de flujo.

La mayoría de las células YFP+ expresan Sca-1 (95.9±0.5%) y CD31 (87%±4.1%) (Fig, 5A). Por otro lado, las células Bmi1+ de corazón adulto no expresan CD45 y c-kit (Fig, 5A).

A pesar de que la gran mayoría de la población Bmi1+ expresa Sca-1, solamente el $5.4\pm 0.4\%$ de la población Sca-1 expresa Bmi1 (YFP+) (Fig, 5B). Estos resultados sugieren que la población Bmi1+ constituye una fracción de la población Sca-1.

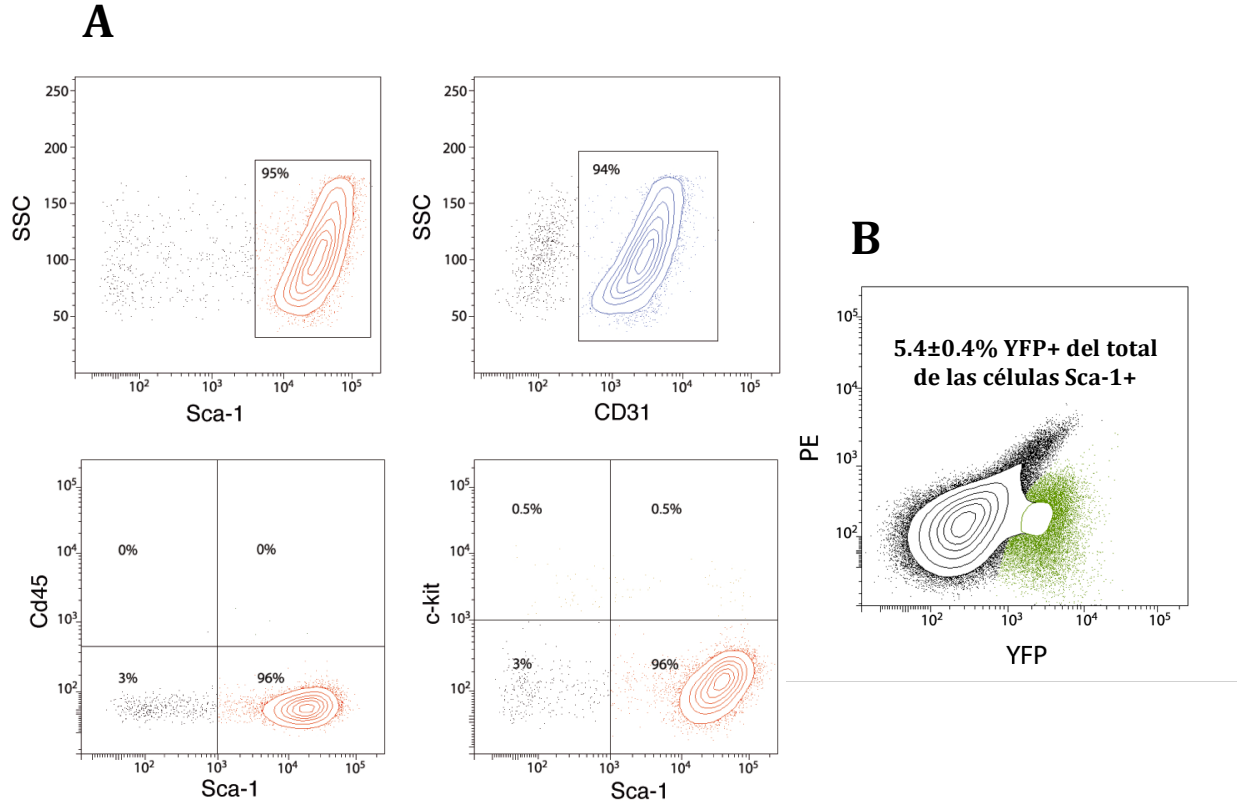


Figura 5. Perfil de expresión de diferentes antígenos de superficie en las células cardíacas Bmi1+.

(A) Las células cardíacas adultas Bmi1+ expresan Sca-1 ($95.9\pm 0.5\%$, $n=16$) y CD31 ($87\%\pm 4.1\%$, $n=4$) pero carecen de la expresión de CD45 ($n=3$) y c-kit ($n=3$), tras 5 días de la inducción con TM.

(B) La población Bmi1+ es una fracción de la población Sca-1 ($5.4\pm 0.4\%$, $n=16$).

PE: Ficoeritrina. SSC: *side scatter*.

1.4. Aislamiento de las células Bmi1+, morfología y caracterización *in vitro* por inmunofluorescencia

Con el fin de profundizar en la caracterización molecular de las células Bmi1+, se puso a punto su aislamiento mediante el FACS. Para este objetivo, los corazones, tanto de animales Bmi1-YFP inducidos con TM como de animales Bmi1-YFP sin inducir, fueron digeridos con colagenasa para obtener la fracción no cardiomiocítica. El proceso de separación (*sorting*) confirmó la presencia, previamente detectada mediante citometría de flujo, y el mismo porcentaje de las células YFP+ (Fig, 6A). El número de células YFP+ obtenidas por corazón se mantuvo constante a lo largo de la realización de esta tesis una vez que las condiciones de su separación fueron optimizadas: $7.9 \times 10^4 \pm 5.9 \times 10^3$ células YFP+ por corazón (Fig, 6B). Uno de los aspectos críticos que influían en la eficiencia de separación era la presión a la que las células eran sometidas durante el *sorting*. Para mantener la eficiencia por encima del 70% se optó por sortear pequeñas cantidades de la fracción no cardiomiocítica cada vez, con el fin de evitar que la presión tuviera una consecuencia negativa sobre la estructura tridimensional de la proteína YFP, traduciéndose en una pérdida de fluorescencia.

Las células Bmi1+ se sembraron en placas de plástico previamente recubiertas con gelatina para incrementar su adhesión. Las células presentan una morfología fibroblastoide (Fig, 6C) y un tiempo de duplicación de 24 horas, además de poseer la capacidad de proliferar durante un mínimo de 20 pases al ser mantenidas en subconfluencia (datos no mostrados), al mismo tiempo que mantuvieron la expresión de la YFP.

Con el fin de estudiar un perfil de marcadores mediante inmunofluorescencia, las células YFP+ sorteadas, fueron sembradas con su medio de cultivo sobre cristales recubiertos con gelatina en placas de 24 pocillos. Para evitar lo máximo posible la manipulación de las células y el cambio de su patrón de expresión génica, tras 24-48h de su siembra, las células fueron fijadas.

El estudio inmunocitoquímico para diferentes marcadores reveló la expresión de BMI1, Sca-1, ABCG2 y CX43 (Fig, 6D). Estos resultados corroboran los resultados obtenidos mediante el estudio de los marcadores de superficie por citometría de flujo.

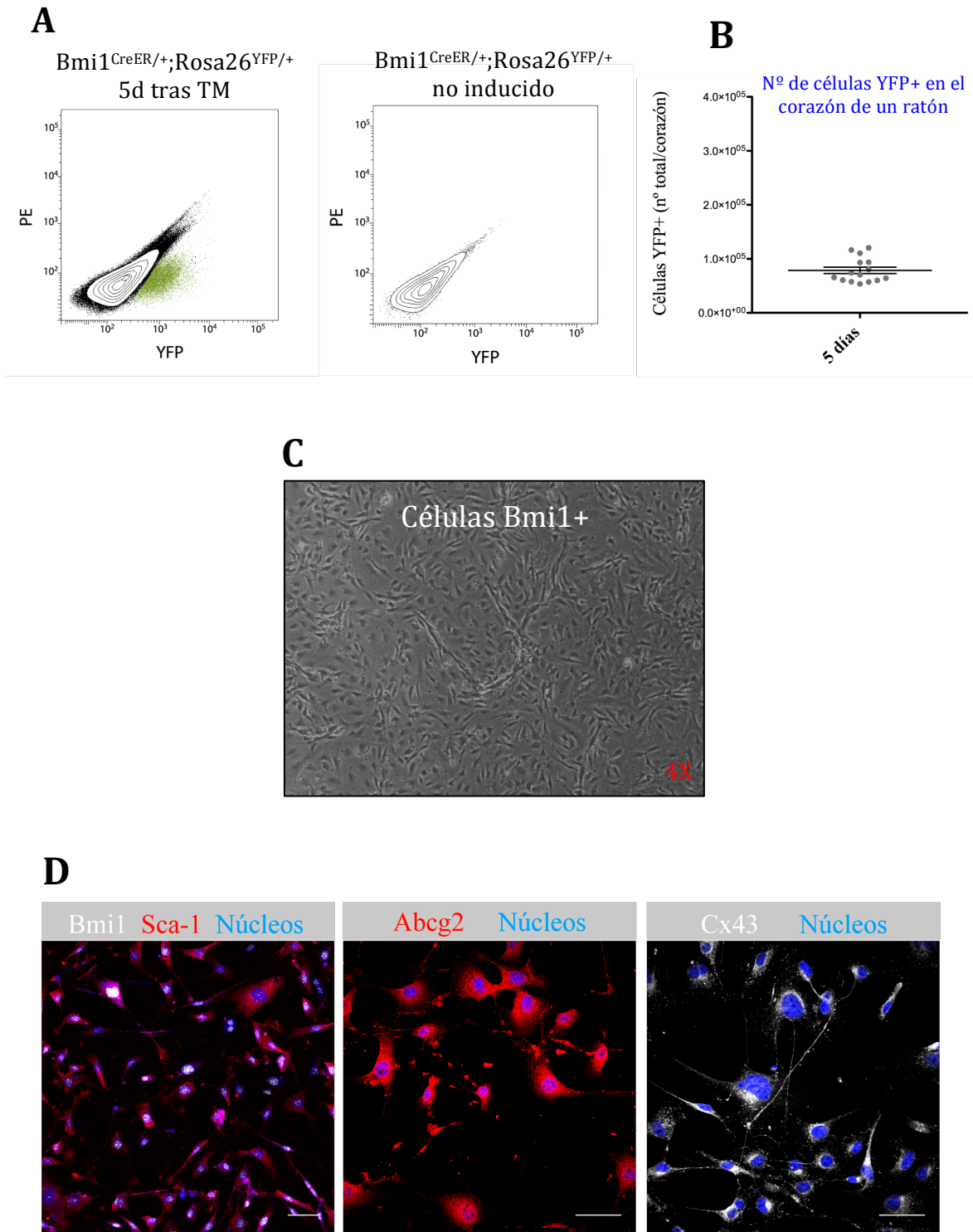


Figura 6. Aislamiento, morfología y análisis inmunocitoquímico de las células Bmi1+.

(A) Patrón de expresión de la proteína YFP durante el *sorting* de corazones de animales Bmi1-YFP tras 5 días de la inducción con TM (izq.) y la ausencia de señal en un control negativo (Bmi1-YFP sin inducir (dcha.)). (B) Representación gráfica del número de células YFP+ obtenidas por *sorting* de cada corazón, tras 5 días de la inducción. (C) Células Bmi1+ en cultivo. (D) Análisis por inmunofluorescencia de células Bmi1+ recién sembradas tras un *sorting*. Las células YFP+ expresan BMI1, Sca-1, ABCG2 y CX43, cinco días después de la inducción. Escalas, 50µm.

1.5. Caracterización de la expresión de Bmi1 en el modelo de explante cardíaco

Típicamente, las células progenitoras cardíacas se han aislado del corazón adulto siguiendo protocolos basados en la digestión enzimática del órgano. Una técnica menos agresiva, que ha sido adoptada por diversos investigadores del campo para la obtención y purificación de células con características de células progenitoras cardíacas, ha sido mediante la técnica del explante cardíaco. Esta técnica consiste en trocear el corazón en pequeños fragmentos, previamente digeridos enzimáticamente para disgregar la matriz extracelular y favorecer la migración celular, y plaquearlos sobre plástico. Al poco tiempo del cultivo aparece una capa de células de tipo fibroblástica. Más tarde migran del explante, sobre esta capa de fibroblastos, células pequeñas, redondeadas y brillantes. Estas células han sido purificadas y descritas como una fracción de células con propiedades de células progenitoras (Messina et al., 2004).

Se optó por realizar esta técnica con el modelo de ratón Bmi1-YFP. Así, corazones de animales Bmi1-YFP previamente inducidos con TM fueron perfundidos con PBS y troceados para ser suavemente digeridos con colagenasa. A los pocos días de su plaqueo, empezaron a establecerse células de tipo fibroblástico (Fig, 7A) que proliferaron durante 2-3 semanas hasta formar una capa celular compacta. A partir de la 2-3 semana emergieron pequeñas células de morfología redondeada y brillante, de igual manera que se había descrito (Messina et al., 2004) (Fig, 7A). Con el objetivo de estudiar la disposición y caracterizar estas pequeñas células brillantes, fijamos el cultivo del explante cuando las células brillantes redondeadas comenzaron a salir del fragmento del corazón. Mediante técnicas inmunocitoquímicas empleando anticuerpos específicos frente a YFP, se observó como una oleada de células YFP+ emergían del explante (Fig, 7B) aparentemente por encima de la capa de fibroblastos. Para comprobar su localización, se realizaron proyecciones ortogonales de las imágenes tomadas mediante microscopía confocal (Fig, 7C) a la vez que, empleando microscopía de campo claro, se vio que los núcleos de las células YFP+ se localizaban en la parte más superior de la estructura, por encima de las células fibroblásticas (Fig, 7D). Estas células YFP+ que emergían de los explantes expresaban Bmi1 (Fig, 7E), dato soportado por el análisis inmunocitoquímico de las células Bmi1-YFP+ recién sorteadas y plaqueadas.

Estos resultados permiten sugerir que Bmi1 identifica la población celular, o al menos una parte importante de ella, que previamente había sido identificada exclusivamente por propiedades morfo-fisiológicas (Messina et al., 2004) como células progenitoras cardíacas.

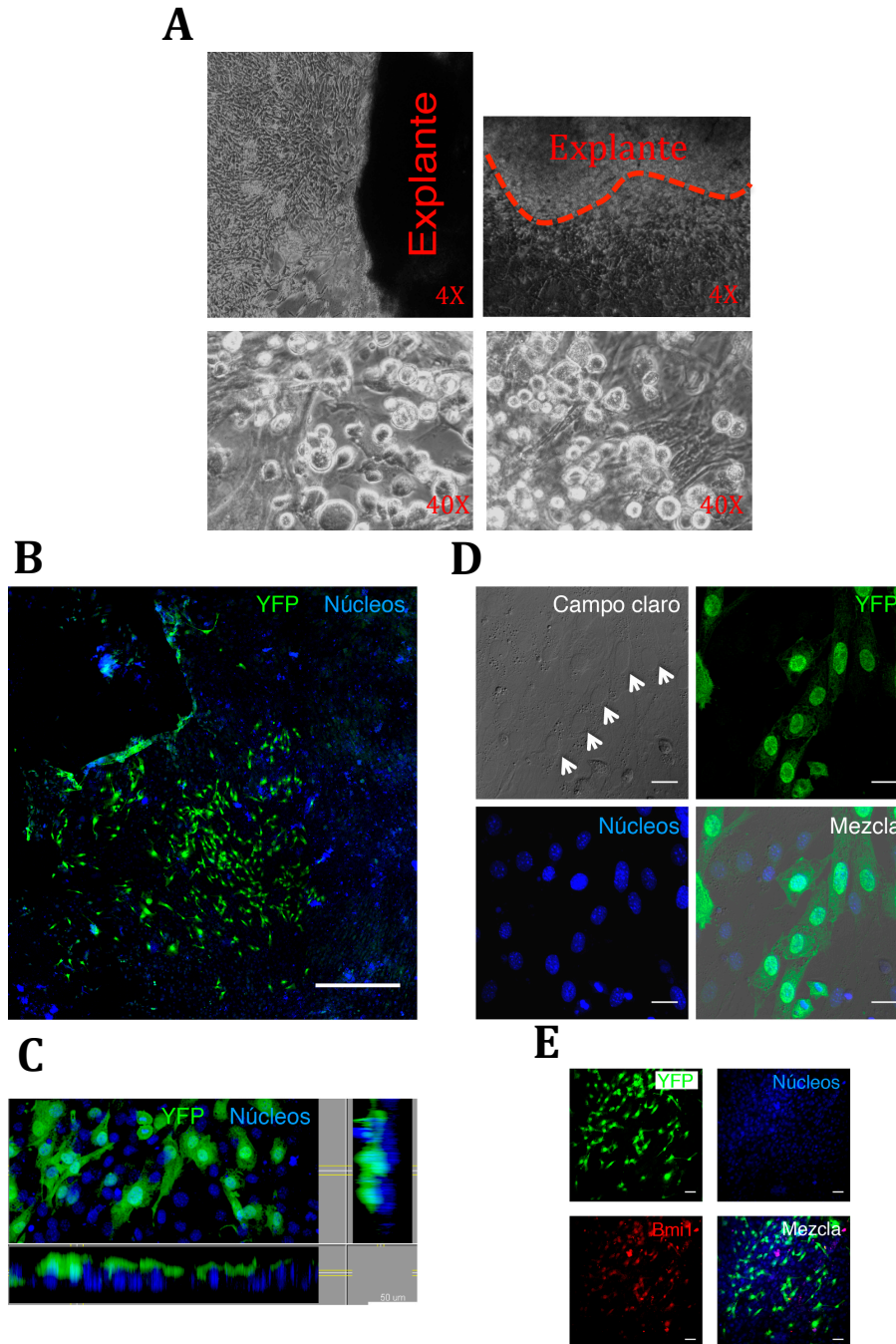


Figura 7. Expresión de Bmi1 en el modelo de explante cardíaco.

(A) Las células fibroblásticas emergen del explante (paneles superiores). La línea roja delimita el fragmento del corazón plaqueado, del tapiz de fibroblastos emergente. Las células esféricas y brillantes migran por encima de la capa fibroblástica (paneles inferiores). (B) Las células YFP+ (verde) emergen espontáneamente del explante y migran por encima de la capa de fibroblastos (azul). Escala 500µm. (C) Proyección ortogonal de las células que migran: las células YFP+ (verde) se encuentran por encima de la capa de fibroblastos (azul), que ocuparían la base del tapiz. Escala, 50µm. (D) La combinación de la microscopía de campo claro y confocal revela que los núcleos de las células YFP+ (flechas blancas) se encuentran por encima de los núcleos de las células fibroblásticas. Escalas, 20µm. (E) Las células YFP+ que emergen de los explantes expresan Bmi1. Escalas, 50µm

1.6. Potencial de formación de cardiosferas de las células Bmi1+

La capacidad de generar esferas ha sido ampliamente estudiada y caracterizada en las células madre nerviosas. La capacidad de formar esferas ha sido utilizada para cultivar y mantener las células en un estado indiferenciado así como para evaluar la capacidad de mantenerse en estado indiferenciado y pluripotente. Además, se ha sugerido que el microambiente generado en las esferas podría mimetizar las condiciones en las que se encuentran las células *in vivo*, es decir, se podrían asemejar a los nichos en los que se encuentran en el órgano que las acoge (Li et al., 2010).

Como medida indirecta de la capacidad de mantenimiento y auto-renovación de las células progenitoras cardíacas llevamos a cabo un análisis comparativo entre las células Bmi1+ (YFP+) y las células Sca-1+Bmi1-(YFP-). A tal efecto, corazones Bmi1-YFP, 5 días tras la inducción con TM, fueron perfundidos y digeridos con colagenasa. La suspensión no cardiomiocítica fue sorteada y del mismo corazón se obtuvieron ambas poblaciones: la población YFP+ y la población Sca-1+YFP-. Las células se sembraron sobre plástico recubierto con gelatina y en su medio de cultivo. Con el objetivo de manipular mínimamente las células en cultivo, tras un pase, las células se disgregaron y se sembraron 2×10^5 células de ambas poblaciones en placas especiales con baja adherencia, con el objetivo de promover la formación de cardiosferas.

El cultivo se monitorizó durante los dos días siguientes bajo una lupa para estudiar la evolución de la formación de las cardiosferas. En ambas poblaciones las cardiosferas tenían una morfología redondeada, carentes de bordes irregulares (Fig, 8A). A simple vista, las diferencias de tamaño de las cardiosferas generadas por ambas poblaciones era evidente. Con el objetivo de cuantificar estas diferencias, se recogieron las cardiosferas y se tomaron fotografías en una lupa de campo claro para contar su número total así como estimar el diámetro medio de todas ellas (Fig, 8B). Tras el conteo de las cardiosferas se pudo llegar a la conclusión de que, a pesar de que las células Sca-1+YFP- son capaces de generar mayor número, no existen diferencias significativas (Fig, 8C). Sin embargo, un análisis minucioso del diámetro de las esferas, mediante el *software* de análisis de imagen Imaris, reveló que existían diferencias significativas entre el tamaño de las cardiosferas generadas por las células Bmi1+ y aquellas formadas por células Sca-1+Bmi1- (Fig, 8D). Estos resultados sugieren una mayor capacidad de auto-mantenimiento por parte de la población de células cardíacas Bmi1+.

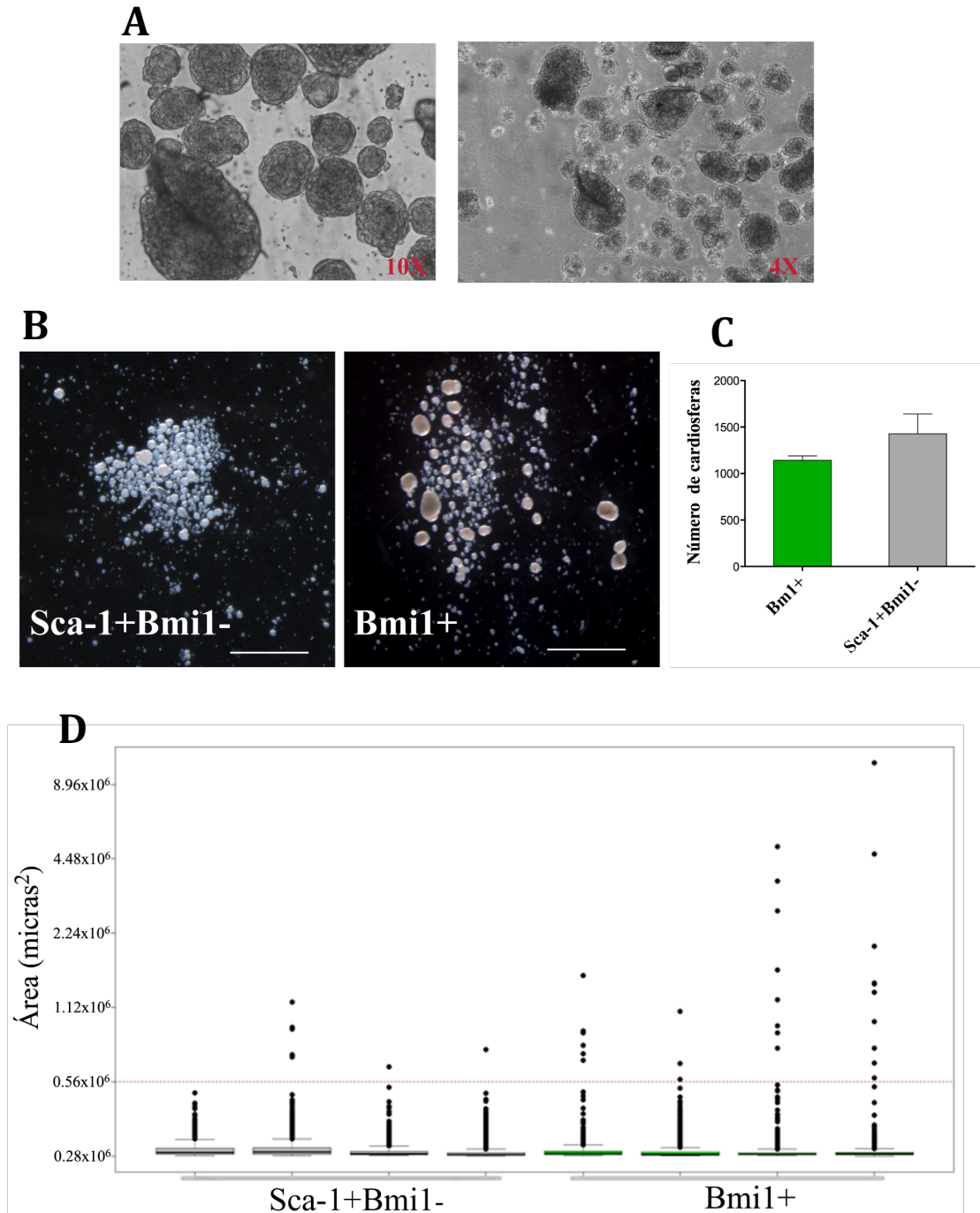


Figura 8. Potencial de flas células Bmi1+ en la formación de cardiósferas.

(A) Morfología típica de las cardiósferas generadas. (B) Imágenes representativas tomadas en campo claro de las cardiósferas formadas por las poblaciones celulares Bmi1+ y Sca-1+Bmi1-. Escalas, 2500µm. (C) Número de cardiósferas generadas por ambas poblaciones; n=4 réplicas; 2 animales por cada réplica. Las diferencias respecto al número de cardiósferas generadas por ambas poblaciones no es significativo (Wilcox test). (D) Distribución del tamaño de las cardiósferas tras 2 días de cultivo (n=4 réplicas; 2 animales por cada réplica). El número de cardiósferas superiores a $5.6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ (línea roja) fue significativamente mayor en las formadas por células Bmi1+ (media=7.5) que en las generadas por las células Sca-1+Bmi1- (media=1.5). *P-valor<0.05. El p-valor se calculó siguiendo el test de Mann-Whitney.

1.7. Estudio del potencial de diferenciación *in vitro* de las células Bmi1+

1.7.1. Potencial de diferenciación de las células Bmi1+ hacia el linaje endotelial y vascular

Las células madre adultas se caracterizan por ser capaces de dar lugar a las células diferenciadas que componen el órgano donde se encuentran alojadas. En teoría, las células madre adultas deberían, por tanto, poseer la potencialidad para generar uno o varios de los tipos celulares diferenciados que componen el órgano, tanto ante una situación fisiológica a lo largo de la vida del animal como ante un daño. Los métodos de diferenciación, *in vitro*, a los distintos linajes del órgano han sido utilizados para evaluar la potencialidad de las células. En el caso del corazón existen tres linajes primordiales: células endoteliales, células de músculo liso y cardiomiocitos.

En este trabajo se quiso estudiar la potencialidad, *in vitro*, de las células Bmi1+ para dar lugar a los distintos linajes del corazón. Como primera aproximación, se partió de una idea muy sencilla: dejar llegar el cultivo celular a confluencia con el fin de detectar si había diferenciación espontánea a alguno de los linajes cardíacos. Cuando el cultivo llegaba a confluencia se pudo detectar la formación espontánea de vasos: células endoteliales + células musculares.

Así, se iniciaron los ensayos de diferenciación con las células Sca-1+ de animales Bmi1-YFP inducidos. Dado que las células Bmi1+ representan un $5.4 \pm 0.4\%$ del total de la población Sca-1, se consideró interesante explorar el potencial de diferenciación de las células Bmi1+ estando embebidas dentro del ambiente de las células Sca-1+. Tras la perfusión con PBS y la digestión con colagenasa de corazones Bmi1-YFP inducidos, las células Sca-1+ fueron sorteadas para posteriormente descartar su fracción CD45+ mediante MACS. A continuación las células fueron plaqueadas en su medio de cultivo sobre plástico previamente recubierto con gelatina. Se monitorizó el crecimiento del cultivo bajo la lupa con el objetivo de detectar las estructuras tubulares típicas que se forman cuando se originan vasos. Una vez que el cultivo alcanzó su confluencia, al cabo de dos semanas, se pudo detectar la presencia de estructuras tubulares extendidas profusamente por la placa de cultivo (Fig 9A y B). En este punto del cultivo, éste se fijó para llevar a cabo un estudio de diferentes marcadores endoteliales y vasculares por inmunofluorescencia.

Las estructuras tubulares estaban formadas por dos tipos de linajes: uno positivo para CD31 y otro positivo para el marcador actina de músculo liso (SMA) (Fig, 9B y C). Al analizar el perfil de expresión de YFP, resultó curioso descubrir que los tubos YFP+ se encontraban perfectamente integrados en los tubos YFP-, formando una red perfectamente continuada y comunicada (Fig, 9C).

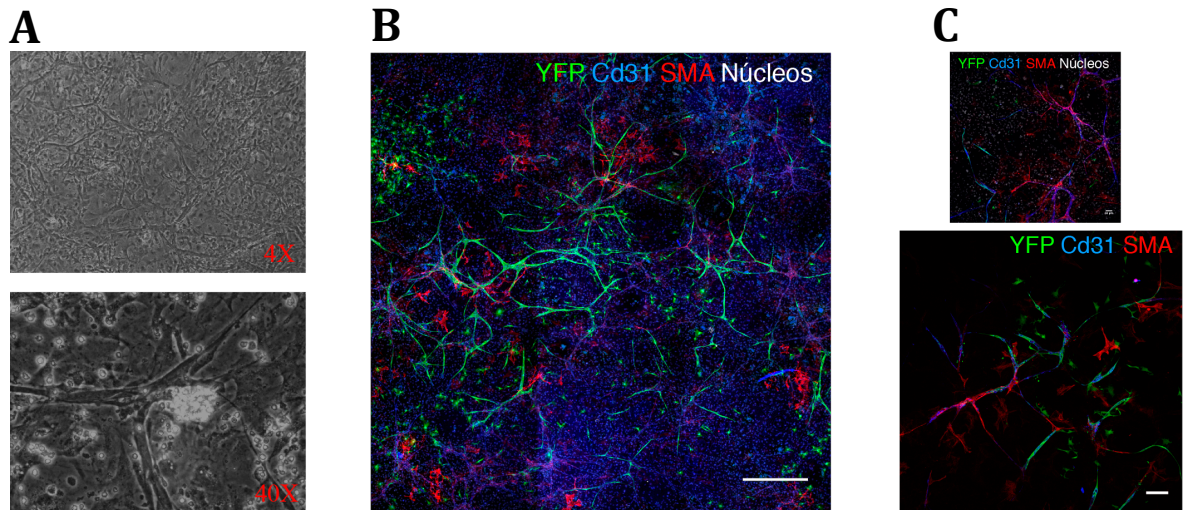


Figura 9. Diferenciación endotelial y vascular de las células Sca-1+ de animales inducidos Bmi1-YFP.

(A) Imágenes de campo claro donde se muestra la red vascular que se extiende profusamente por la placa de cultivo (panel superior) y el detalle de uno de los tubos (panel inferior) en el cultivo de las células Sca-1+. (B) Diferenciación espontánea de las células YFP+ en el ambiente de las células Sca-1. Escala, 500µm. (C) Detalle de la integración de los tubos endoteliales formados por las células YFP+ en la red tubular generada por las células Sca-1+. Escala panel superior, 50µm; escala panel inferior 100µm.

El siguiente paso fue comprobar si las células Bmi1+ tenían el mismo potencial cuando se cultivaban solas. Con este objetivo, se sembraron células Bmi1+, en las mismas condiciones, hasta alcanzar su confluencia. Tras dos semanas, también se detectaron estructuras tubulares, pero a diferencia de la población Sca-1+, donde la red tubular estaba ampliamente extendida, las estructuras tubulares generadas por las células Bmi1+ eran esporádicas pero muy complejas e intrincadas (Fig, 10A). Al realizar el análisis de los marcadores CD31 y SMA por inmunofluorescencia se pudo apreciar como ambos linajes estaban perfectamente yuxtapuestos y las células SMA+ rodeaban a las CD31+ (Fig, 10B). También se utilizó el marcaje con la cadena pesada de la actina de músculo liso (smMHC) que es un marcador de diferenciación de musculatura lisa que denota mayor madurez en la diferenciación. Este marcaje reveló que el centro de las estructuras tubulares contenían células positivas para smMHC (Fig, 10C). Además, la tinción frente a Ve-cadherina, marcador típico endotelial, demostró expresión en las estructuras tubulares (Fig, 10D).

Estos resultados sugieren una clara capacidad de diferenciación de las células Bmi1+ hacia los linajes endotelial y vascular.

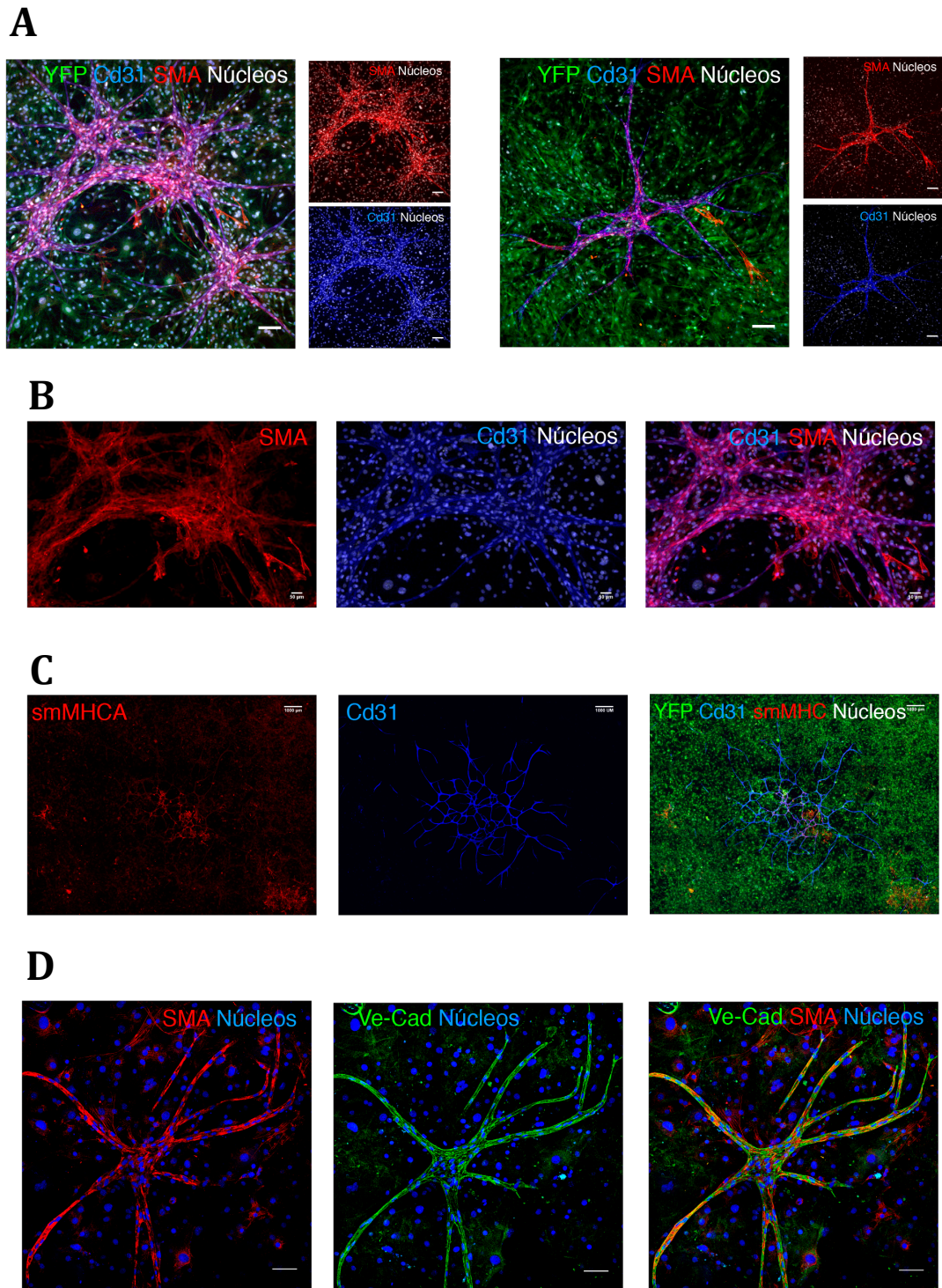


Figura 10. Diferenciación endotelial y vascular de las células Bmi1+

(A) Diferenciación espontánea de las células YFP+, cuando son sembradas solas, hacia el linaje endotelial (células CD31+) y el linaje vascular (células SMA+). Escalas, 100µm. (B) Detalle de la yuxtaposición entre el linaje vascular y el endotelial en las células YFP+ diferenciadas. Escalas 50µm. (C) Expresión del marcador de linaje vascular tardío smMHC en las células YFP diferenciadas. Escalas, 1000µm. (D) Expresión del marcador endotelial Ve-Cardherina (Ve-cad) en las células YFP+ diferenciadas. Escalas, 200µm.

1.7.2. Potencial cardiomiogénico de las células Bmi1+

Sin lugar a dudas, probar el potencial cardiomiogénico de las células progenitoras cardíacas ha sido uno de los retos del campo prácticamente desde su nacimiento. Inicialmente, para estudiar el potencial cardiomiogénico de las células Bmi1+, se llevaron a cabo distintos protocolos de diferenciación descritos en la literatura basados fundamentalmente en la adición de determinados compuestos químicos que favorecieran la diferenciación hacia el linaje cardiomiogénico (Gaudesius et al., 2003; Oh et al., 2003). Durante este trabajo se probaron la oxitocina, la dexametasona y la 5-azacitidina como candidatos para promover la diferenciación de las células Bmi1+ a cardiomiocitos. En ningún caso se pudo confirmar una expresión coherente de marcadores cardíacos ni por RT-qPCR ni por inmunofluorescencia (datos no mostrados).

La siguiente técnica adoptada para inducir la diferenciación cardiomiogénica fue mediante la técnica de co-cultivo de las células YFP+ con cardiomiocitos neonatales de rata. Este procedimiento ha sido uno de los más empleados para estudiar y evaluar el potencial cardiomiogénico de diferentes poblaciones de células progenitoras (Badorff et al., 2003; Chang et al., 2006; Koninckx et al., 2009; Lagostena et al., 2005; Messina et al., 2004; Orlandi et al., 2008). Uno de los motivos por lo que esta técnica es empleada para promover la diferenciación puede ser debido al contacto directo entre las células madre y los propios cardiomiocitos. No solamente la adición de un cóctel químico bastaría para su diferenciación, sino el estrecho contacto, que permitiera un flujo de información a través las uniones gap (Arminan et al., 2009) y nanotubos (Koyanagi et al., 2005) así como el acoplamiento eléctrico serían clave para promover una diferenciación cardíaca de las células madre.

Para evaluar el efecto del co-cultivo sobre la diferenciación de las células Bmi1+, se aislaron cardiomiocitos neonatales de rata y se co-cultivaron con cardiosferas de células YFP+ obtenidas como se ha descrito anteriormente. El co-cultivo se monitorizó bajo el microscopio de campo claro y fluorescencia con el objetivo de evaluar la evolución de las células YFP+. Las cardiosferas se adhirieron a los cardiomiocitos neonatales a las pocas horas de su plaqueo y, tras 2-3 días, las células integrantes de las cardiosferas comenzaron a salir de las esferas y a migrar adoptando una disposición heterogénea sobre la placa de cultivo. Tras un periodo de entre 7 y 15 días se fijó el co-cultivo para llevar a cabo un estudio inmunocitoquímico de marcadores típicos de cardiomiocitos como alfa actinina sarcomérica (SαA), junto con anticuerpos específicos contra YFP. Se encontraron células mononucleadas YFP+ que expresaban SαA pero con baja frecuencia (Fig, 11).

Estos resultados permiten sugerir que las células Bmi1+ retienen una capacidad cardiomiogénica.

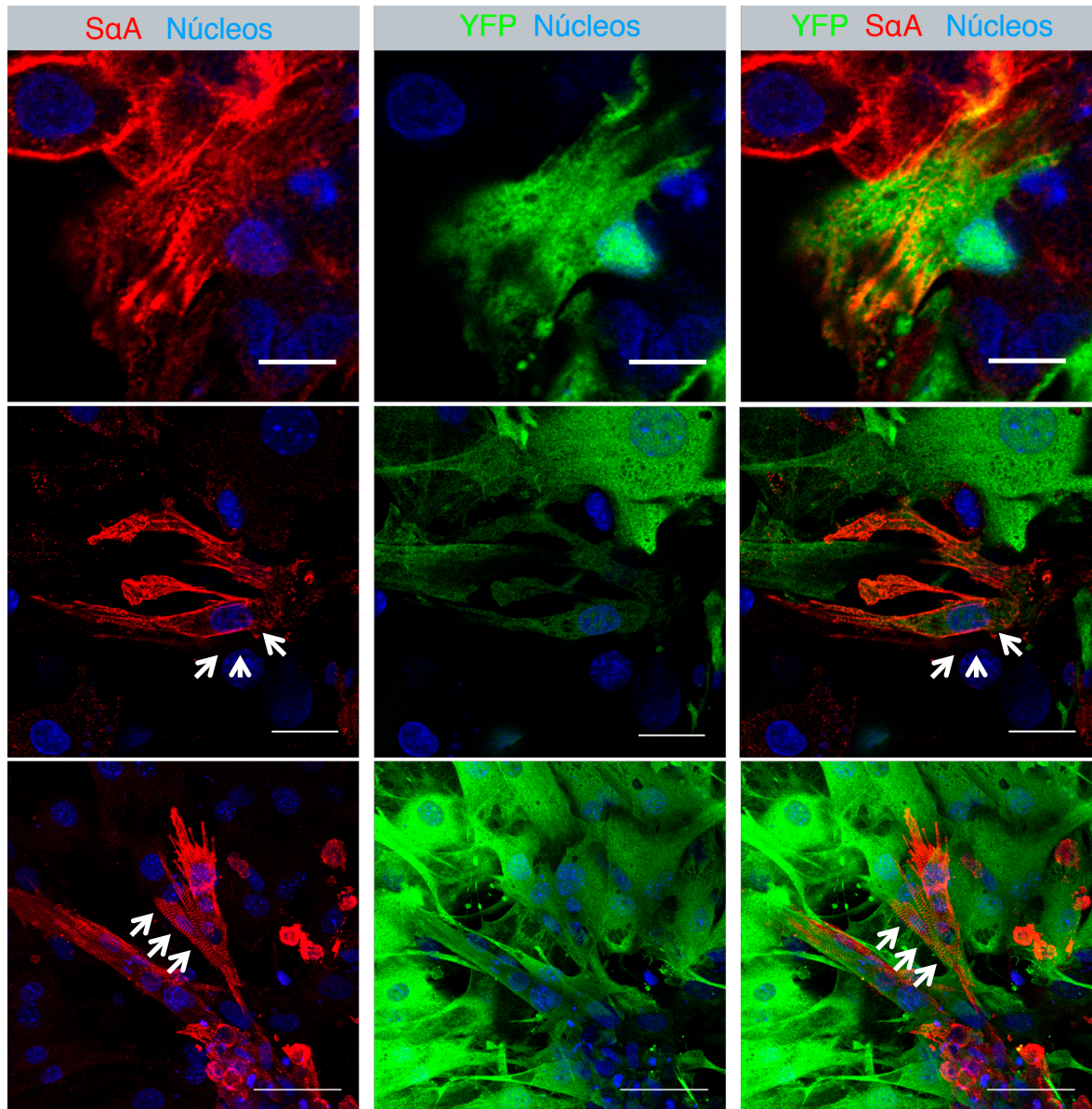


Figura 11. Potencial cardiomiogénico de las células cardíacas Bmi1+.

Una baja proporción de células Bmi1+, co-cultivadas con cardiomiocitos neonatales de rata, tienden a diferenciarse hacia el linaje cardiomiogénico, co-expresando la proteína α -actina sarcomérica (SaA). Escalas panel superior 10 μ m; panel intermedio 20 μ m y panel inferior 50 μ m. Las flechas blancas indican las células YFP+ diferenciadas hacia el linaje cardiomiocítico.

1.8. Estudio del transcriptoma de las células Bmi1+ del corazón adulto

Con el objetivo de caracterizar en profundidad la población Bmi1+, se llevó a cabo el estudio de su transcriptoma, comparándolo con la población Sca-1+Bmi1-.

Para ello, 5 días después de la inducción con TM se extrajo y se separó por *sorting* la fracción no cardiomiocítica de 24 corazones procedentes de animales Bmi1-YFP de 6-8 semanas de edad. Los corazones fueron perfundidos con PBS y digeridos con colagenasa. La fracción Bmi1+ se separó por FACS en base a la expresión de YFP (Bmi1+YFP+) mientras que la fracción Sca-1+Bmi1- se separó por marcaje con Sca-1 y su negatividad para YFP (Sca-1+YFP-). Tras obtener la población Sca-1+YFP- se eliminó la sub-población positiva para CD45 mediante la técnica de MACS. Los 24 corazones se dividieron para obtener 4 réplicas en las que se incluyeron 6 corazones por cada una de ellas, obteniendo un total de 4×10^5 células de ambas poblaciones por réplica. Del *pellet* celular se obtuvo el ARN, que se empleó para llevar a cabo el análisis de RNAseq, cómo se describe en métodos.

El posterior análisis bioinformático reveló una clara separación en el transcriptoma de ambas poblaciones como se muestra en la figura 12A mediante el *Heat map*.

De un total de 37686 transcritos procesados, 4555 (12%) genes se encontraron diferencialmente expresados en las poblaciones YFP+ y las Sca-1+YFP-. De ellos, 4394 se correspondieron a proteínas codificantes, 55 a transcritos procesados, 67 a *long non-codings* ARN, 2 a IG_C_ genes, 2 a ARN misceláneos y 2 a ARN mitocondriales.

Con el objetivo de validar alguno de los genes diferencialmente expresados en ambas poblaciones, se sortearon las células YFP+ y Sca-1+YFP- de corazones de animales Bmi1-YFP inducidos con TM. Las funciones principales elegidas para la comparación fueron aquellas relacionadas con pluripotencia y diferenciación. La expresión de genes como Oct-4 y Bmi1 fue significativamente superior en las células Bmi1+ así como los genes analizados, típicamente expresados en cardiomiocitos maduros, tales como la Myh6 o troponina T (Fig. 12B). Estos resultados corroboran, en parte, los resultados obtenidos en el RNAseq.

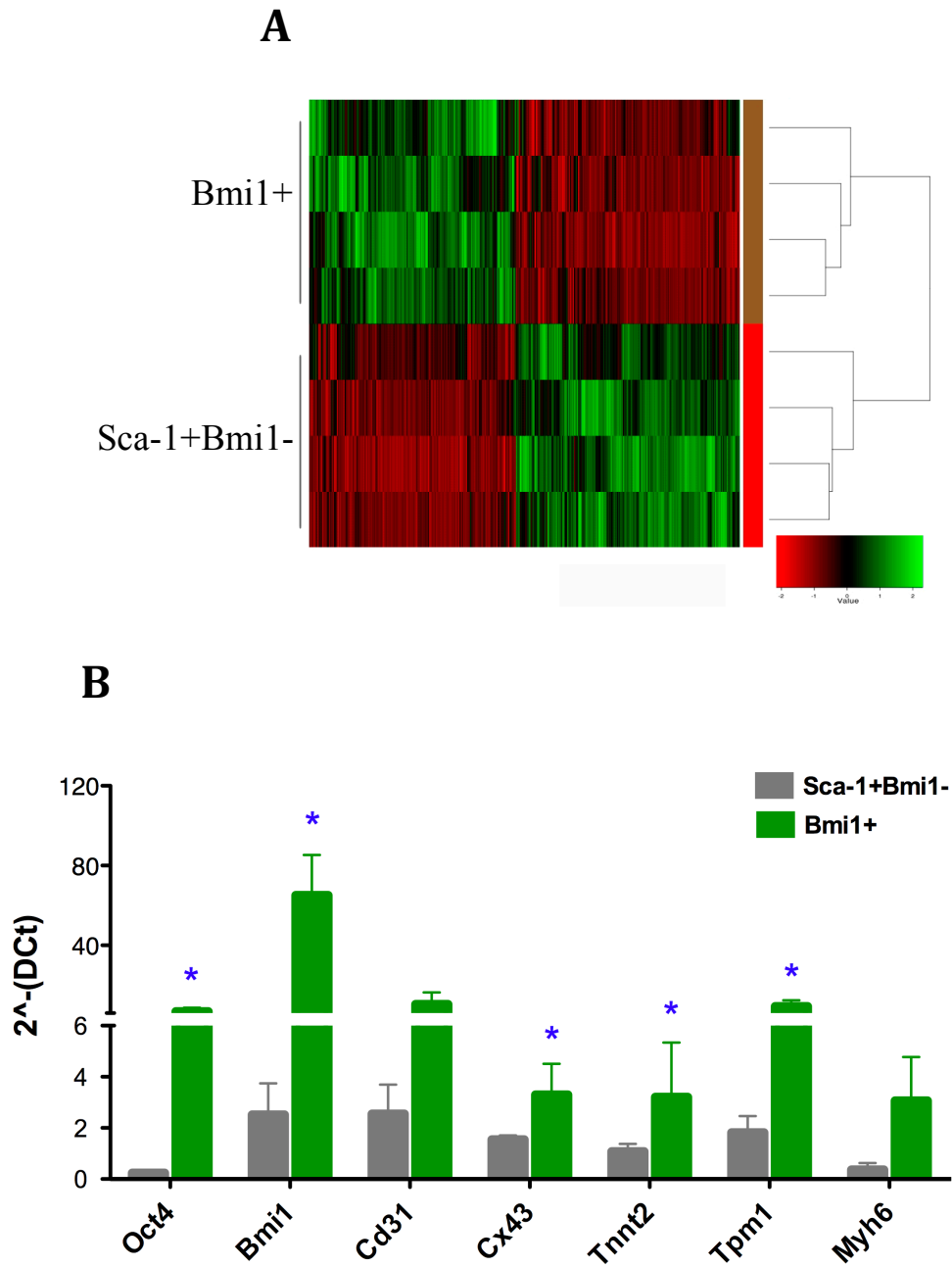


Figura 12. Estudio del transcriptoma de las células cardíacas Bmi1+. *Heat map* y validación por RT-qPCR.

(A) Representación gráfica, en código de colores *-Heat map-*, de las poblaciones Bmi1+ y Sca-1+Bmi1- (n=4 réplicas; 6 ratones por réplica) analizadas en el estudio del transcriptoma. (B) RT-qPCR de células recién sorteadas Bmi1+ y Sca-1+Bmi1- para validar algunos genes candidatos seleccionados del estudio del transcriptoma (n=3 réplicas; 2-3 ratones por réplica). Los P-valores fueron calculados por el T-test pareado. *P-valor<0.05. Los datos representados son la media \pm SEM.

Para conocer las principales funciones implicadas en la biología de ambas poblaciones se recurrió al *software* FATIGO (<http://bioinfo.cipf.es/babelomicswiki/tool:fatigo>). Este análisis reveló que funciones relacionadas con la contracción muscular, el sistema circulatorio y sistema inmune eran las más representadas en la población Bmi1+. Sin embargo, las principales funciones de las células Sca-1+Bmi1- eran aquellas implicadas en la reparación tisular, proliferación epitelial y desarrollo esquelético. (Fig. 13).

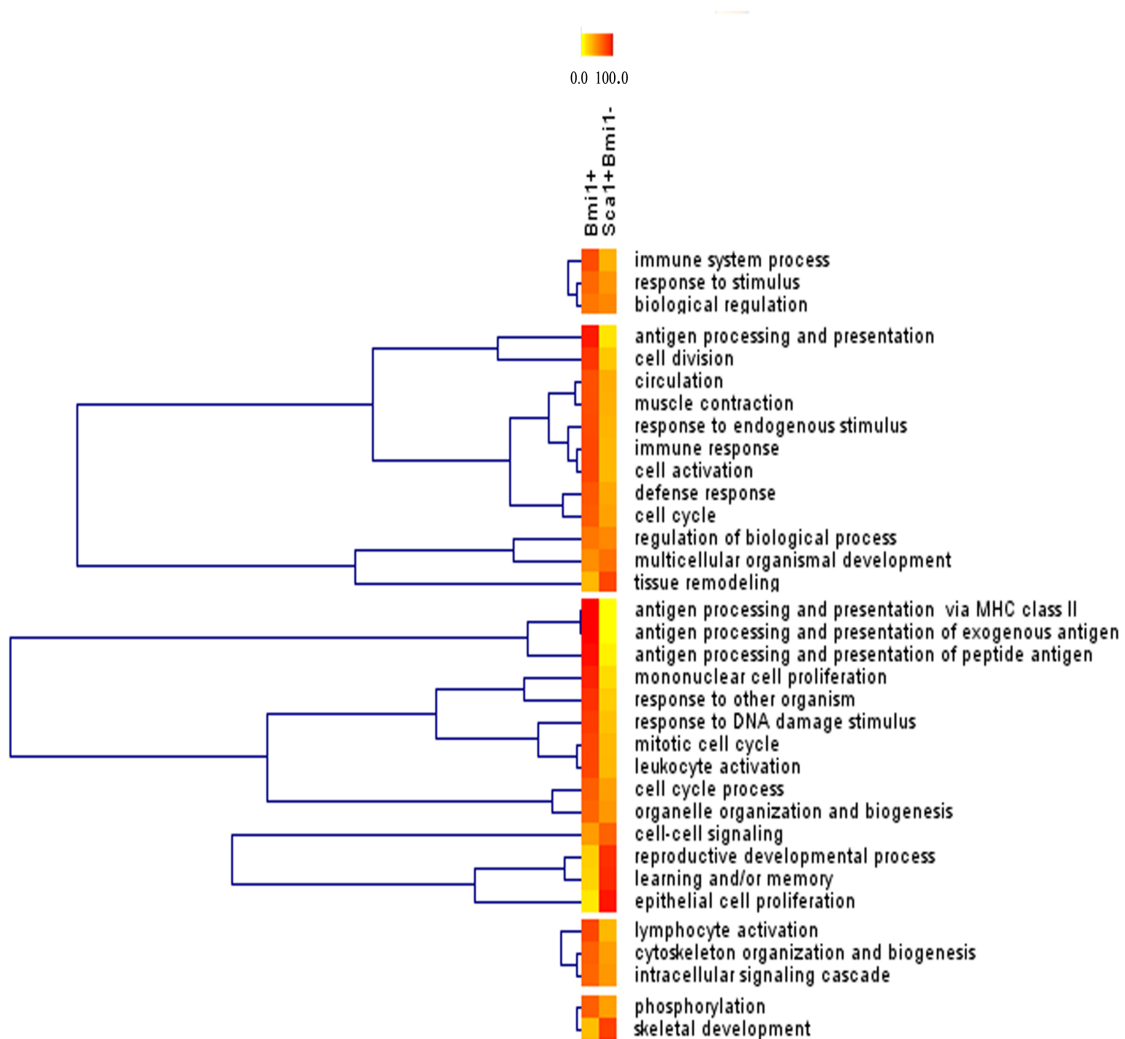
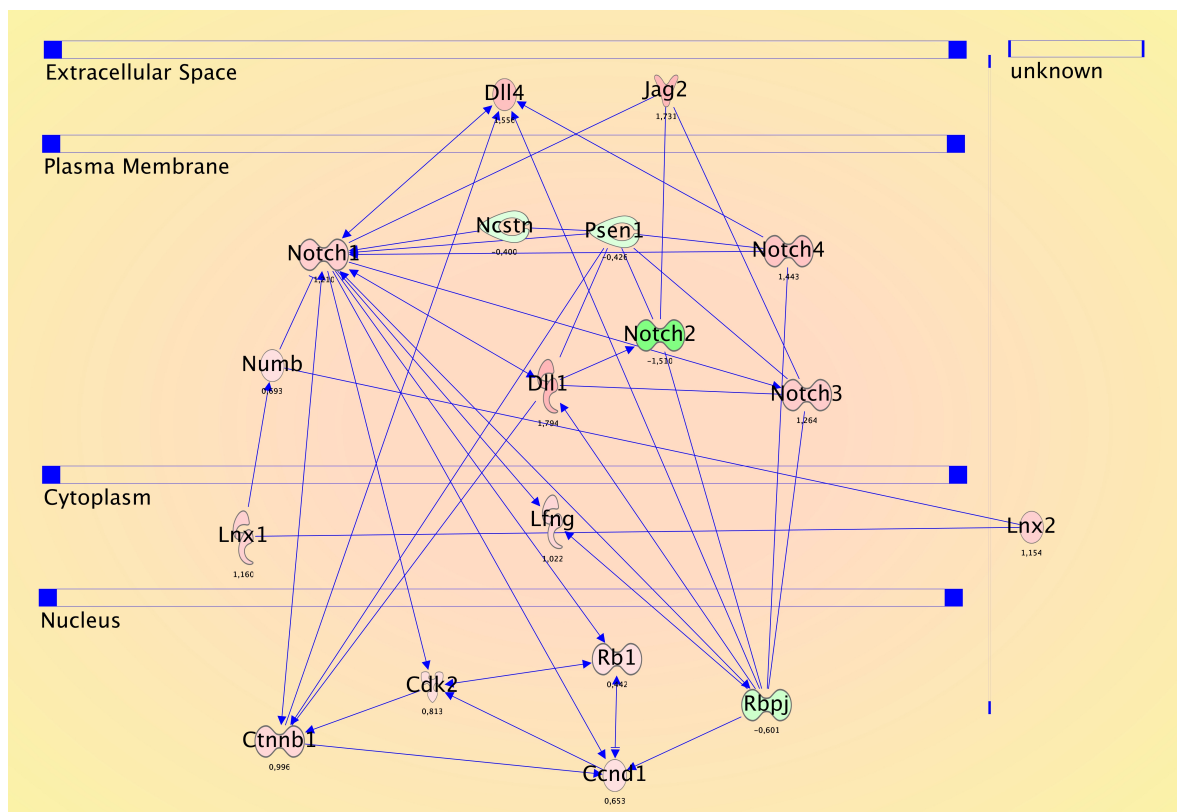


Figura 13. Estudio del transcriptoma de las células cardíacas Bmi1+. Funciones más representadas en las células Bmi1+ y en las Sca-1+Bmi1-.

Heat map del *software* FATIGO incluyendo los genes del estudio del transcriptoma diferencialmente expresados (P-valor <0.05) entre la población Bmi1+ (rojo) y la población Sca-1+Bmi1+ (amarillo), destacando las funciones más representadas de ambas poblaciones.

Notch ha sido descrito ampliamente como una ruta de señalización clave para el desarrollo cardíaco. Al analizar los principales componentes de la ruta Notch se observó que tanto los ligandos Notch 1, 2 y 4 como los transmisores internos celulares de la ruta de señalización estaban sobre expresados en las células Bmi1+ (Fig, 15A). Por otro lado, al analizar diversos marcadores de linaje cardíaco fue posible detectar la expresión diferencial en las células Bmi1+ tanto de genes de cardiomiocitos tales como la Myh6, Tnnt2 o la tropomiosina como de genes relacionados con los canales de calcio (Fig, 15B).

A



B

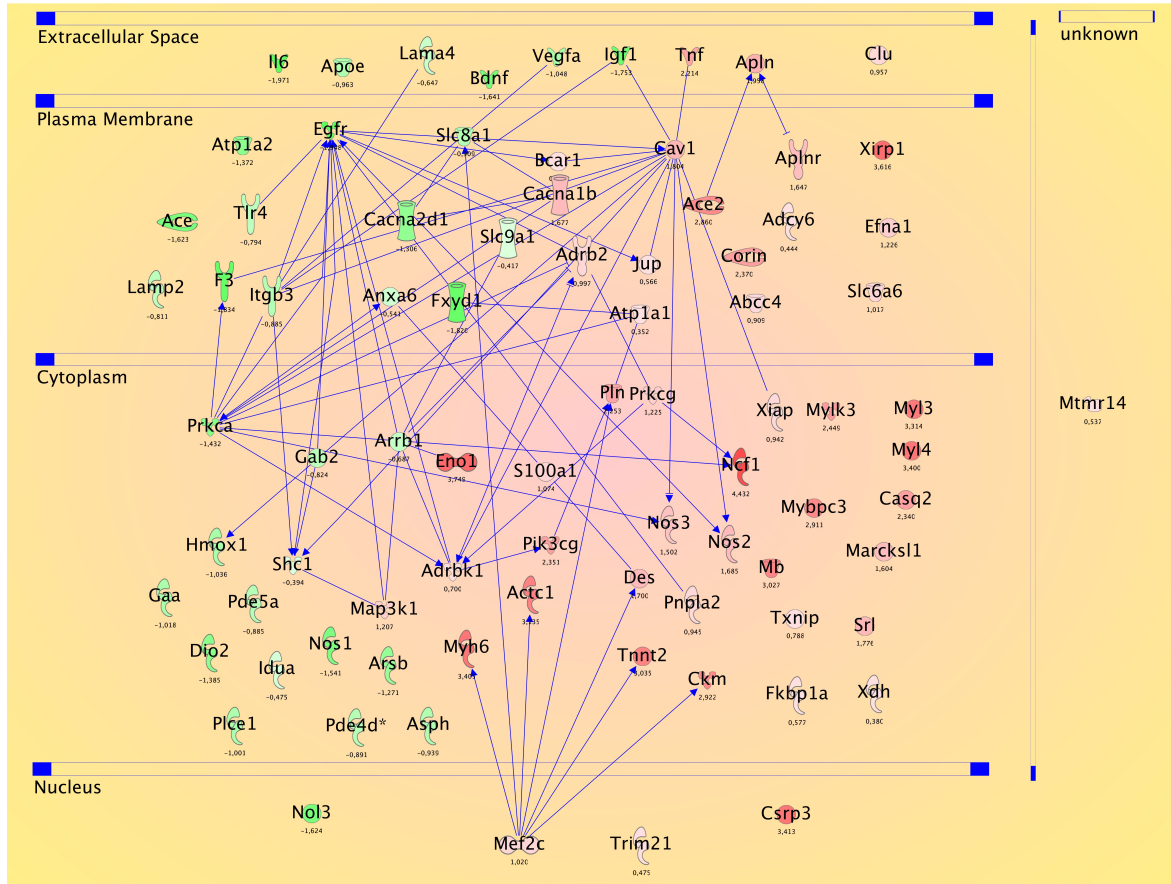
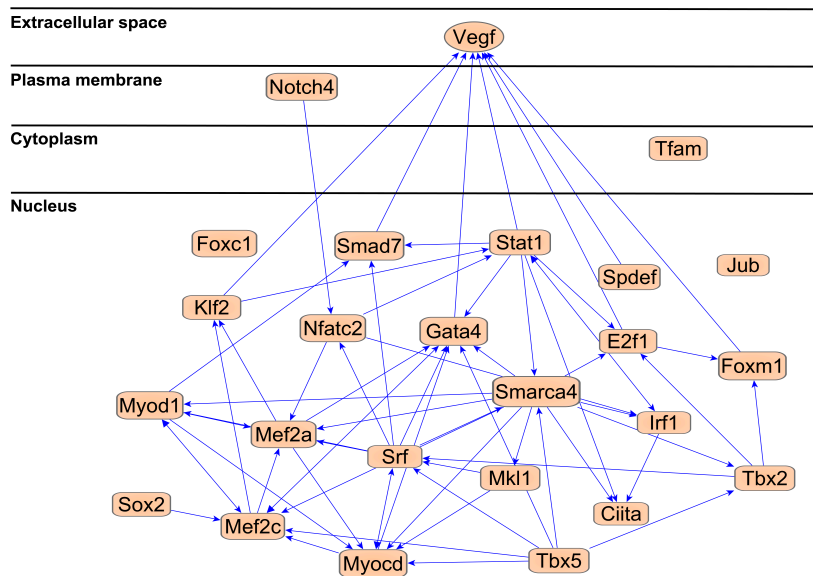


Figura 15. Estudio del transcriptoma de las células cardíacas Bmi1+. Notch y contractilidad.

(A) Análisis de la vía de Notch con el software *Ingenuity Pathway Analysis*. (B) Estudio de las proteínas relacionadas con la contracción cardíaca así como las relacionadas con canales de calcio mediante el IPA. Los números debajo de los genes son el log FC.

El software *Ingenuity Pathway* nos permitió predecir los reguladores que se encuentran aguas arriba de los genes sobre expresados en ambos tipos celulares. En el caso de las células Bmi1+ cabe destacar el papel de Klf2 y Sox2 como reguladores de las rutas relacionados con el mantenimiento de un estado pluripotente celular, además de genes clave en la regulación del desarrollo cardíaco como Tbx5, Myocd, Mef2c y Gata4 entre otros (Fig, 16A). Sin embargo, fue curioso descubrir que en el caso de las células Sca-1+Bmi1- los principales reguladores celulares fueran factores de crecimiento como Tgfb, Pdfgb y Bmp (Fig, 16 B).

A



B

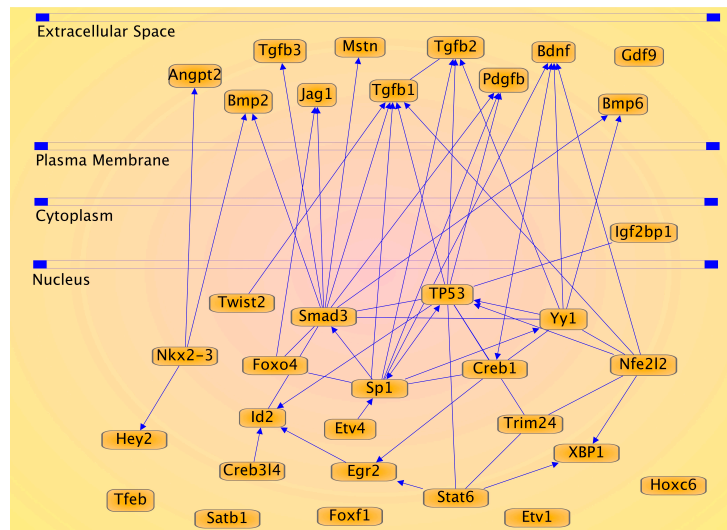


Figura 16. Estudio del transcriptoma de las células cardíacas Bmi1+. Genes reguladores.

(A) Predicción de los genes reguladores candidatos en la población Bmi1+ mediante el IPA.

(B) Predicción de los genes reguladores candidatos en la población Sca-1+Bmi1- mediante el IPA.

En conclusión, los datos obtenidos del estudio del transcriptoma sugieren que las células Bmi1+ se encuentran en un estadio más pluripotente que las Sca-1+YFP- pero conteniendo los transcritos necesarios para una diferenciación cardíaca.

2. Trazado de linaje de las células cardíacas Bmi1+.

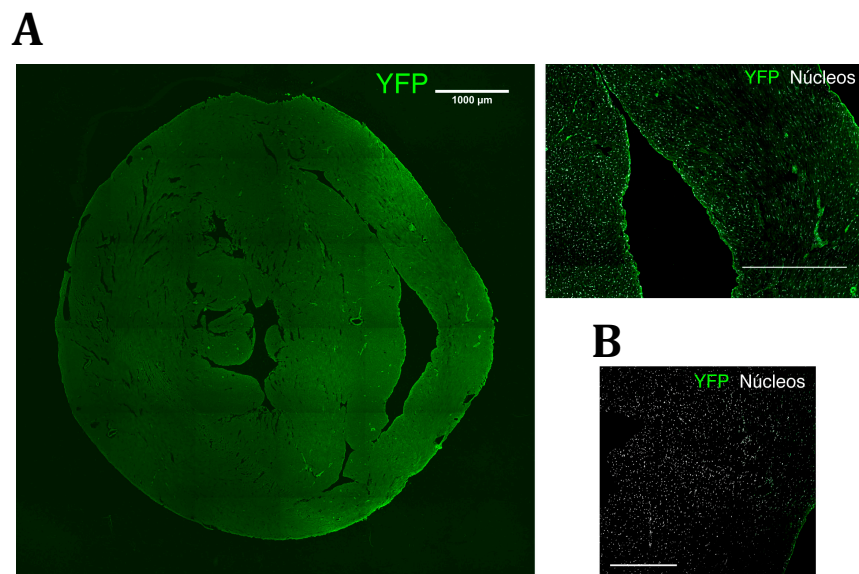
Implicación en la renovación de los cardiomiocitos durante la homeostasis del órgano

2.1 Localización de las células Bmi1+ en el corazón adulto

Uno de los aspectos clave en el estudio de la biología de las células madre consiste en conocer en profundidad el microambiente que las rodea, ya que éste juega una función primordial en su comportamiento.

Con el objetivo de iniciar esta caracterización y localizar a las células Bmi1+ en el corazón adulto, animales Bmi1-YFP de 6-8 semanas de edad fueron inducidos con TM y a los 5 días los corazones fueron perfundidos con PBS, embebidos en OCT y seccionados en finos cortes para llevar a cabo la inmunodetección de la proteína YFP. La detección de la YFP reveló una distribución dispersa de las células YFP+ (Fig, 17A), ausentes en el control negativo: corazones de animales Bmi1-YFP sin inducir con TM (Fig, 17B).

En los corazones Bmi1-YFP, 5 días tras la inducción con TM, la marca YFP+ se pudo detectar prácticamente en todas las secciones (Fig, 17C) distribuidas a lo largo de los ventrículos y las aurículas sin seguir, aparentemente, un patrón anatómico concreto. Las células YFP+ estaban fundamentalmente agrupadas o concentradas en *clusters* de tamaño variable. A estas estructuras las denominamos estructuras en forma de nicho (Fig, 17C y D). Estos *clusters* YFP+ se localizaron entre los paquetes del músculo esquelético cardíaco, embebidos en ellos (Fig, 17C).



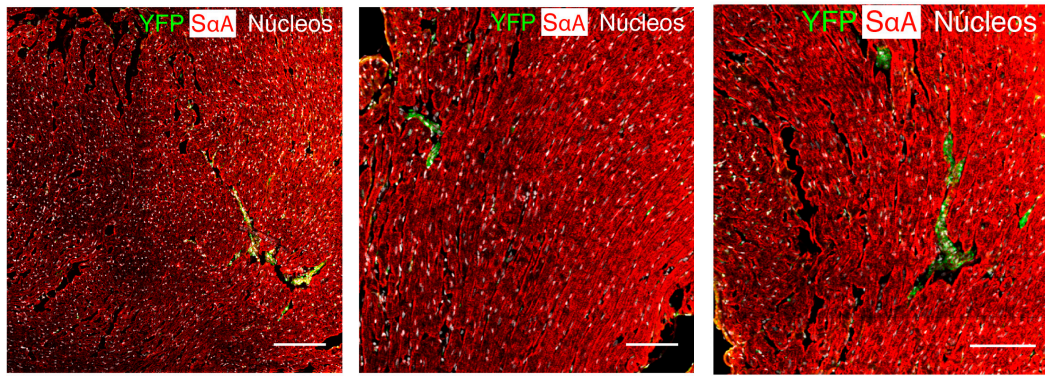
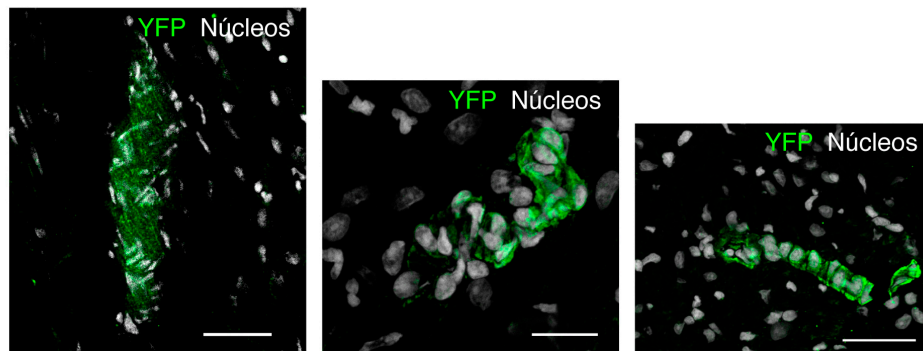
C**D**

Figura 17. Localización de las células Bmi1+ en el corazón adulto de ratón 5 días tras la inducción con TM.

(A) Detección de la expresión de la proteína YFP mediante inmunohistoquímica: sección transversal de un corazón adulto Bmi1-YFP (panel izq. Escala, 1000 μ m) y detalle de un *cluster* YFP+ en la pared del ventrículo derecho (panel dcho. Escala, 500 μ m). (B) Inmunohistoquímica contra YFP en un corazón de un animal Bmi1-YFP sin inducir. Escala 200 μ m. (C) Distribución heterogénea de los nichos YFP+ embebidos en los sarcómeros a lo largo del corazón. Escalas, 200 μ m. (D) Detalle de nichos formados por células YFP+. Escalas, 20 μ m.

Para continuar con la caracterización de la población Bmi1+, se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico de diferentes marcados en los *clusters* YFP+. Las células YFP+ de los *clusters* expresan las proteínas Sca-1, CD31, BMI1 y están rodeados de laminina (componente principal de la lámina basal) (Fig, 18). Estos resultados están soportados por los obtenidos al realizar los estudios por la citometría de flujo y la inmunocitoquímica de las células Bmi1+ recién aisladas.

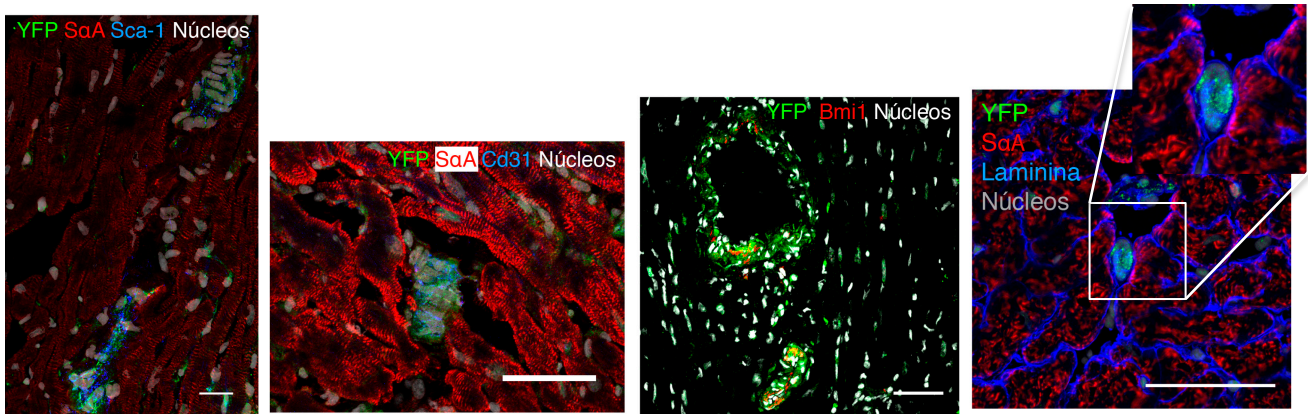


Figura 18. Localización de las células Bmi1+ en el corazón adulto de ratón 5 días tras la inducción. Caracterización.

Co-expresión de los marcadores Sca-1, CD31, BMI1 en los clústeres YFP+. Los nichos de células YFP+ se encuentran rodeados de laminina. Escalas, 50µm, excepto la del panel izq., 20µm.

Otro patrón adicional de células YFP+ se localizó en la cercanía de los vasos sanguíneos de diversos diámetros (Fig, 19), fundamentalmente en los de gran calibre, no en los capilares o en vasos pequeños. En este emplazamiento, las células YFP+ se encuentran localizadas bien en la pared o en las proximidades, pero no se han detectado células YFP+ localizadas en el lumen que pudiese sugerir una diferenciación de las células Bmi1+ hacia el linaje endotelial.

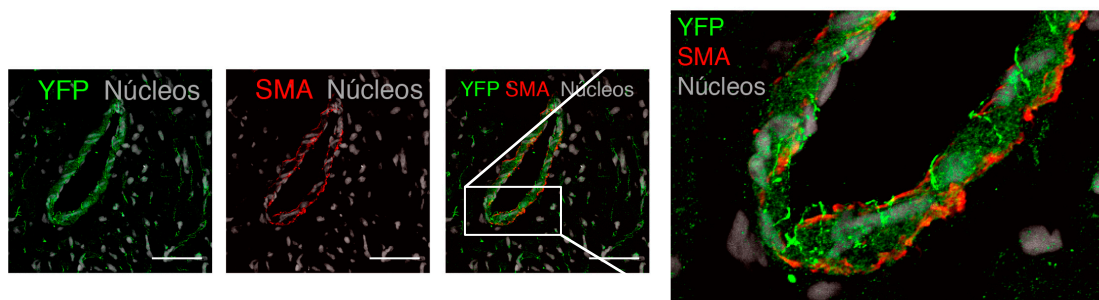


Figura 19. Localización de las células Bmi1+ en el corazón adulto de ratón 5 días tras la inducción. Patrón vascular.

Localización de células YFP+ en la pared de los vasos sanguíneos pero no en el lumen. Escala, 50µm.

Estos resultados confirman la presencia de las células Bmi1+ en el corazón adulto de ratón, localizadas principalmente en *clusters* distribuidos por todo el órgano.

2.2. Capacidad de auto-mantenimiento de las células Bmi1+

Una de las propiedades fundamentales por las que una célula madre puede ser definida como tal es por su capacidad de auto-mantenimiento. Esta propiedad implica que las células madre pueden perdurar durante largos periodos de tiempo en el organismo sin perder sus propiedades de multipotencia.

En este trabajo se quiso estudiar la evolución de la población Bmi1+ a lo largo de la vida del organismo. Para ello, la primera aproximación realizada fue inducir con TM animales Bmi1-YFP de 6-8 semanas de edad y estudiar la evolución de las células progenitoras Bmi1+ a lo largo del tiempo. Tras 5 días, 1 y 2 años de la inducción, los corazones fueron perfundidos con PBS y posteriormente digeridos con colagenasa. La fracción no cardiomiocítica YFP+ fue sorteada (Fig, 19A). El número de células YFP+ por corazón, 5 días después de la inducción, fue de $7.9 \times 10^4 \pm 5.9 \times 10^3$ (Fig, 19B). Transcurrido un año de la inducción, el número de células YFP+ de la fracción no cardiomiocítica experimentó un ligero incremento al obtenido tras 5 días de inducción: $17 \pm 1.6 \times 10^4$ (Fig, 19B). Sin embargo el mayor incremento se observó al obtener las células YFP+ 2 años después de la inducción: $25 \pm 4.4 \times 10^4$ (Fig, 19B). Este resultado demuestra que las células no sólo se mantienen sino que parecen aumentan en número a lo largo de la vida del organismo.

Sin embargo estos datos no nos permiten conocer si todas las células sorteadas son células Bmi1+ o, en un determinado porcentaje, podría corresponderse con su progenie. Para intentar dilucidarlo, animales Bmi1-YFP de 1 y 2 años de edad fueron inducidos con TM y, 5 días después, se sorteó la fracción no cardiomiocítica (Fig, 19A). Animales de un año de edad contenían un número de células Bmi1+ similar a los animales jóvenes tras 5 días de la inducción $10 \pm 2.5 \times 10^4$ (Fig, 19B). Sin embargo los animales de dos años de edad albergaban un número significativamente menor de células Bmi1+ ($4.4 \pm 1.9 \times 10^4$) comparado con los animales jóvenes (Fig, 19B).

Conjuntamente estos resultados permiten sugerir que las células Bmi1+ son capaces de auto-mantenerse a lo largo de la vida del animal, así como de estar presentes en animales de edad avanzada.

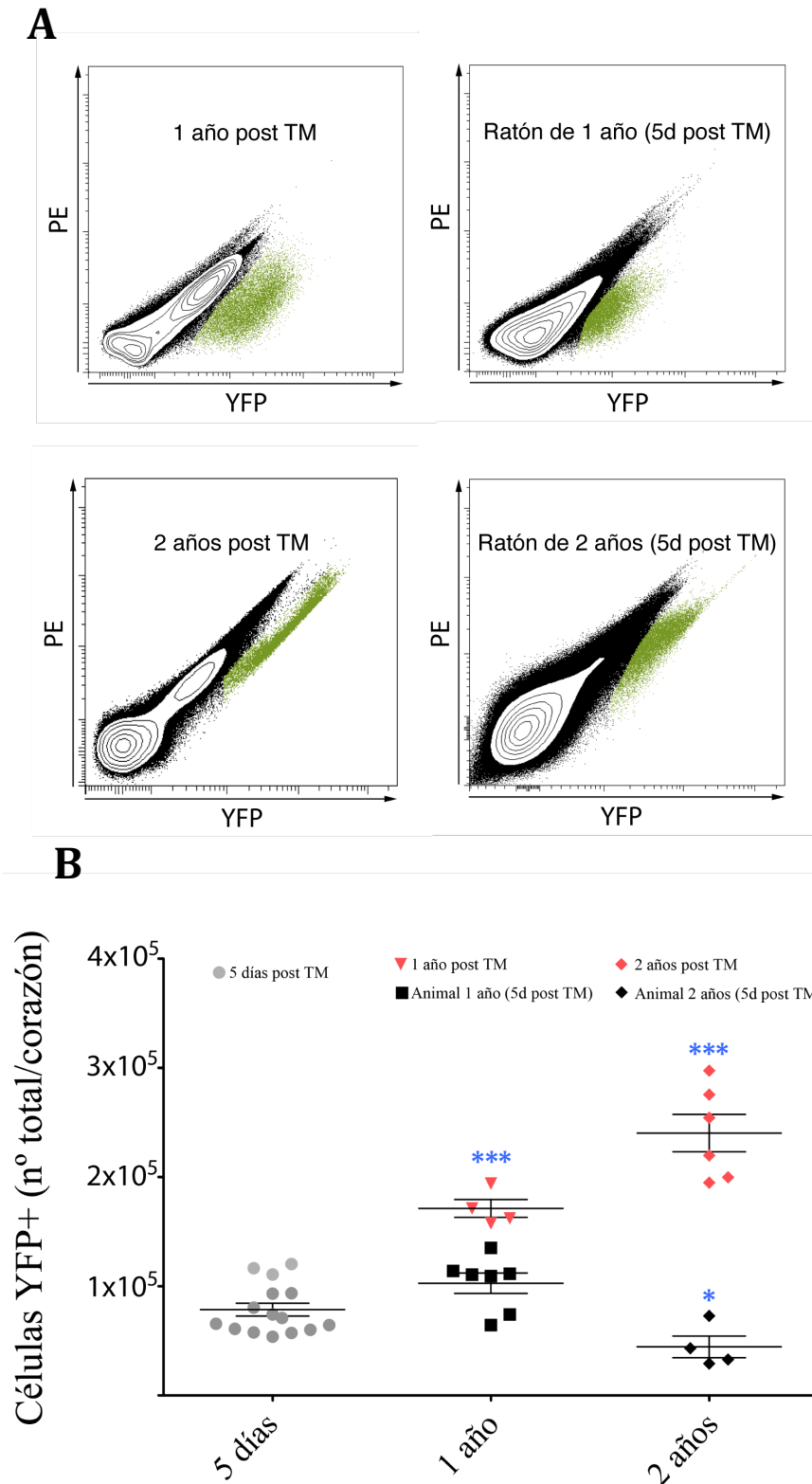


Figura 19. Las células Bmi1+ y su capacidad de auto-mantenimiento en el corazón adulto.

(A) El análisis mediante FACS de las células YFP+ demostró su persistencia en los corazones de animales Bmi1-YFP (6-8 semanas de edad) tras 1-2 años de la inducción con TM (izq.). El análisis por FACS tras 5 días de la inducción con TM en animales Bmi1-YFP de 1 y 2 años de edad, reveló la presencia de una población Bmi1+ (dcha.) en corazones envejecidos. (B) Número de células

YFP+ obtenidas en animales Bmi1-YFP (6-8 semanas de edad) tras 5 días, 1 año y 2 años de la inducción con TM y las obtenidas tras 5 días de la inducción en animales Bmi1-YFP de 1 y 2 años de edad. Los P-valores fueron calculados mediante un T-test, aplicando la corrección de Welch. Las comparaciones se realizaron con respecto al valor obtenido en animales jóvenes tras 5 días de la inducción. *P-valor<0.05; ***P-valor<0.0001. Los datos se han representado como la media \pm la SEM.

2.3. Perfil de marcadores en las células Bmi1+ a lo largo de la vida del animal

Como se ha descrito anteriormente, las células Bmi1+ de animales de 6-8 semanas de edad expresaban los marcadores de superficie Sca-1 y CD31 pero carecían de la expresión de c-kit y CD45. Con el objetivo de estudiar si el perfil de expresión de estos marcadores variaba a lo largo de la vida del ratón, se analizó la población YFP+ obtenida tanto de animales Bmi1-YFP (6-8 semanas de edad), inducidos con TM y cazados a los 2, 12 y 24 meses, como de animales Bmi1-YFP de 2 y 12 meses de edad inducidos a esas edades y aislada la población YFP+ a los 5 días tras la inducción.

El perfil de expresión de Sca-1, CD31, CD45 y c-kit se mantuvo constante en las células YFP+ a lo largo del tiempo de estudio (Fig, 20), tanto cuando se indujo a animales jóvenes y se cazó la población meses después, como al inducir animales envejecidos y cazados tras 5 días (Fig, 21), y, a su vez, muy similar al observado en células YFP+ tras 5 días de la inducción. Sólo se observaron pequeños cambios en el perfil de expresión en animales muy mayores posiblemente debidos al envejecimiento celular. La mayor parte de las células YFP+ seguían siendo positivas para Sca-1 y CD31 y negativas para c-kit y CD45 en ambas condiciones de inducción.

Estos resultados sugieren que la población de células madre definidas por Bmi1 presenta un patrón homogéneo y estable de expresión de los marcadores antigénicos Sca-1, CD31, CD45 y c-kit a lo largo de la vida del animal.

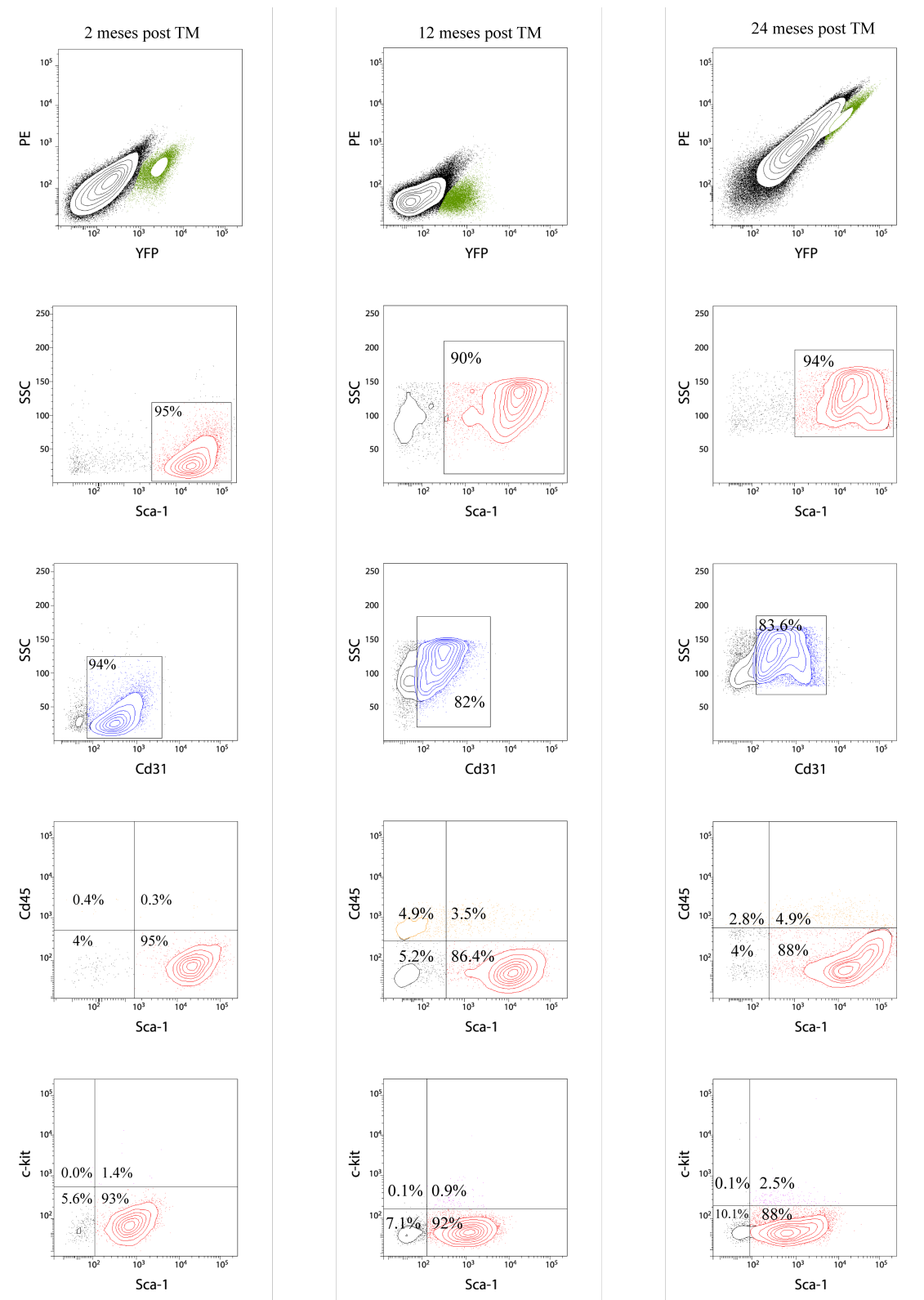


Figura 20. Estudio de marcadores de superficie de las células Bmi1+ a lo largo de la vida del organismo.

Análisis de la expresión de los marcadores Sca-1, CD31, CD45 y c-kit en la población YFP+ porcedente de animales inducidos Bmi1-YFP a las 6-8 semanas de edad cazados a los 2, 12 y 24 meses después de la inducción. PE: ficoeritrina, SSC: *side scatter*.

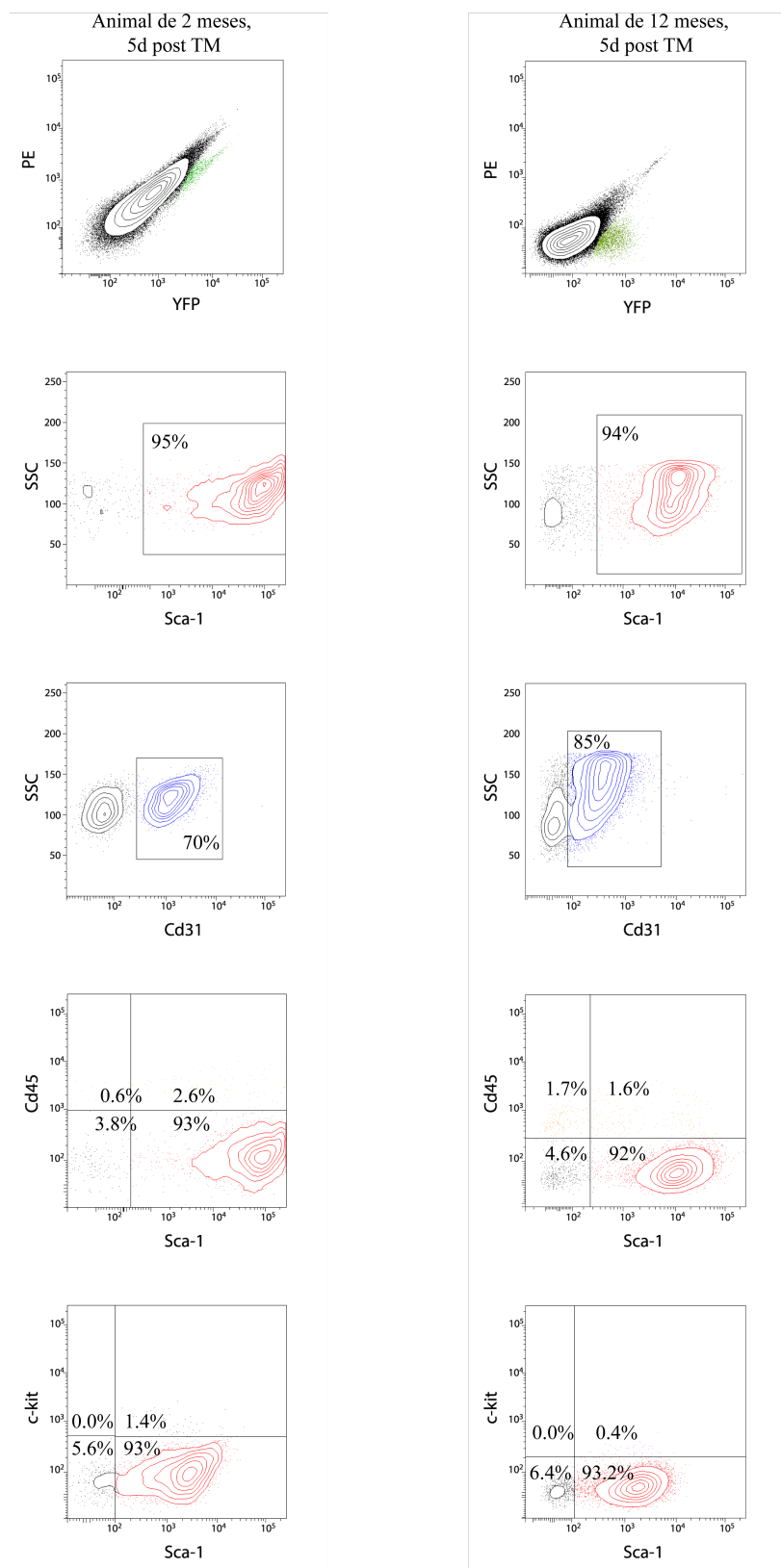


Figura 21. Estudio de marcadores de superficie de las células Bmi1+ a lo largo de la vida del organismo.

Análisis de la expresión de los marcadores Sca-1, Cd31, Cd45 y c-kit en la población YFP+ procedente de animales Bmi1-YFP de 2 y 12 meses de edad, inducidos a esa edad y cazados 5 días después de la inducción. PE: ficoeritrina, SSC: *side scatter*.

2.4. Localización de las células YFP+ tras 2 meses de la inducción

El análisis inmunohistoquímico de corazones de animales Bmi1-YFP tras 2 meses de la inducción con TM demostró que los *clusters* de células YFP+ seguían estando presentes en el corazón. De nuevo, las células YFP+ que conforman los *clusters* expresaban CD31, Sca-1 y BMI1. (Fig, 22A).

El tamaño de determinados *clusters* YFP+ se vio incrementado en comparación con los detectados a 5 días, (Fig, 22B).

Estos resultados sugieren que la población es mantenida durante este periodo de tiempo en el mismo tipo de estructuras y no varía en cuanto a los marcadores de nicho analizados después de 5 días de la inducción.

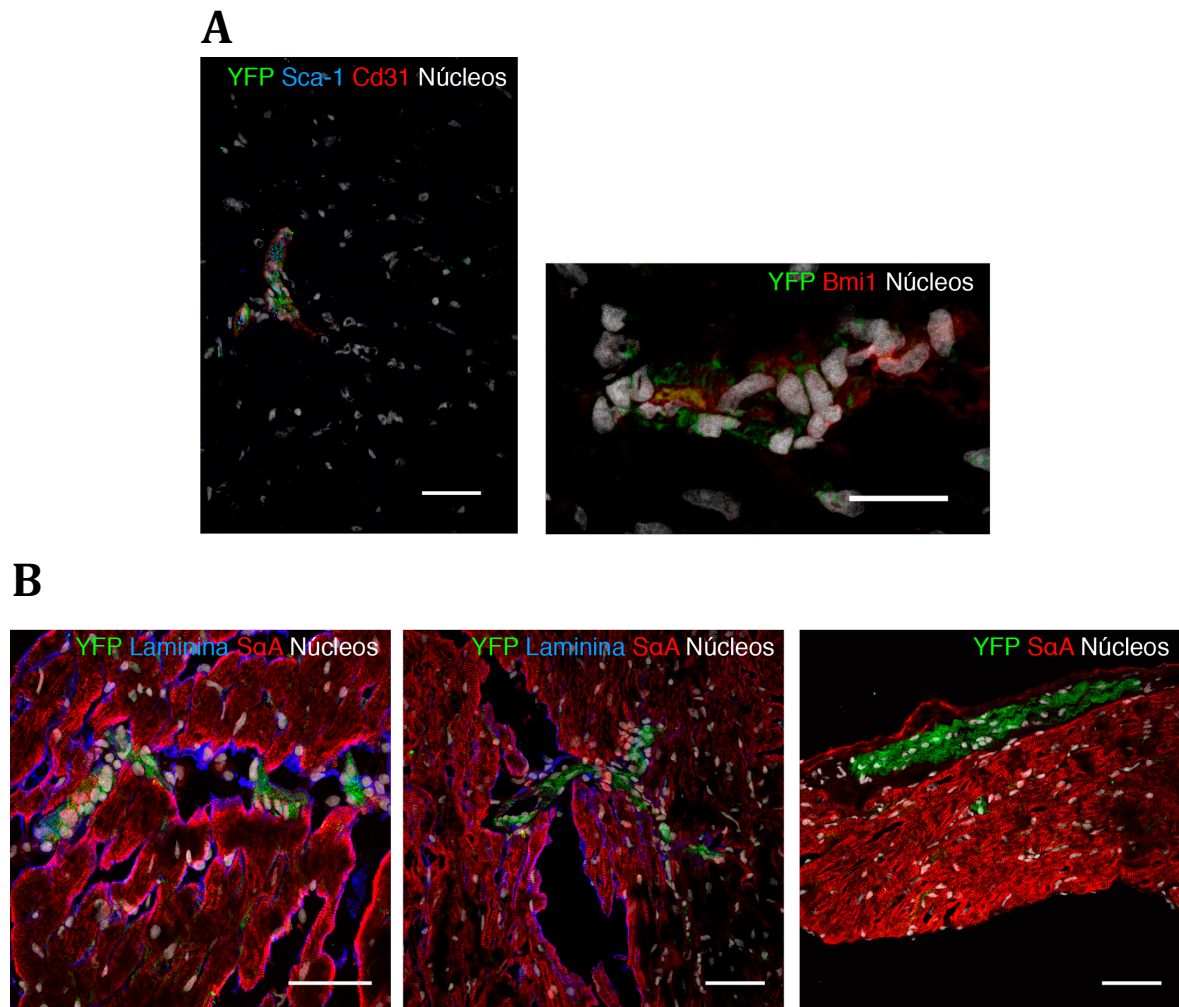


Figura 22. Nichos YFP+ tras 2 meses de la inducción.

(A) Tras dos meses de la inducción, las células YFP+ de los *clusters* localizados en el corazón mantienen la expresión de Sca-1, CD31 y BMI1. Escalas, 20µm. (B) El tamaño de los nichos aumentó sensiblemente con respecto a los observados después de 5 días de la inducción.

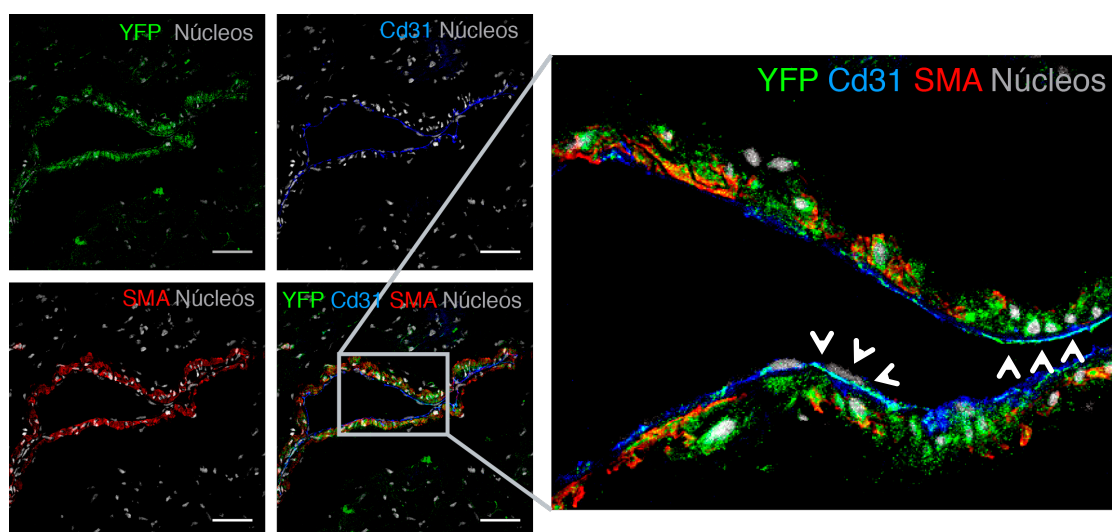
2.5. Diferenciación *in vivo* de las células Bmi1+ hacia el linaje endotelial

Las células endoteliales que recubren la luz interna de los vasos sanguíneos están sometidas a una presión hemodinámica constante que se traduce en la modulación de sus funciones celulares tales como la permeabilidad, apoptosis o migración (Li et al., 2005). Por tanto, la homeostasis del linaje endotelial debe estar delicadamente controlada continuamente.

Dado que parte de las células YFP+ se encontraron localizadas en la pared de vasos de gran calibre, se quiso estudiar el potencial de las células Bmi1+ para diferenciarse hacia el linaje endotelial *in vivo*, al igual que se ha descrito con otras poblaciones de células progenitoras endoteliales (Urbich & Dimmeler, 2004).

Con este objetivo, se compararon cortes histológicos de corazones de animales Bmi1-YFP que habían sido inducidos hacia 2 meses *versus* los obtenidos 5 días después de la inducción. Tras realizar la inmunodetección de YFP, el estudio se centró en detectar las células YFP+ en los vasos sanguíneos. Dos meses después de la inducción, además de las agrupaciones (*clusters*) de células YFP+ cercanos al vaso o las células YFP+ integradas en la pared, se pudo observar la localización de la marca YFP en las células endoteliales de la luz del vaso, co-expresando CD31 (Fig. 23). Este fenómeno no se observó en ningún caso a los 5 días después de la inducción.

Estos resultados permiten sugerir que las células Bmi1+ son capaces de llevar a cabo una diferenciación hacia el linaje endotelial *in vivo*.



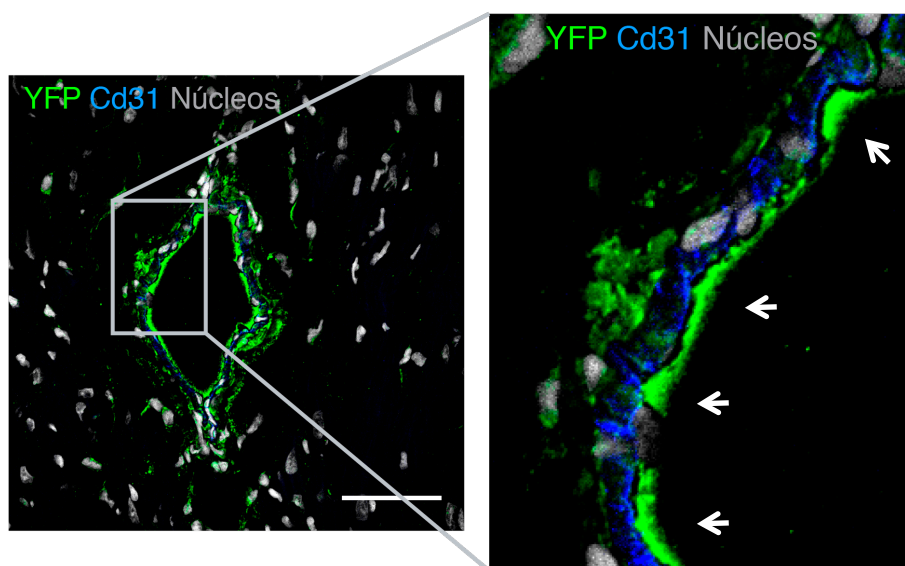


Figura 23. Contribución de las células Bmi1+ en la homeostasis del endotelio cardíaco *in vivo*.

Las células Bmi1+ se diferencian hacia el linaje endotelial después de 2 meses de la inducción con TM. Una pequeña fracción de la marca YFP+ se localiza en el lumen de los vasos co-expresando CD31 (flechas blancas). Escalas, 50µm.

2.6. Potencial cardiomiogénico de las células Bmi1+ *in vivo*

Uno de los aspectos más controvertidos en el campo de las células madre cardíacas es la demostración de su potencial para formar nuevos cardiomiocitos (CM) *in vivo* durante la homeostasis del corazón. Las estrategias relacionadas con un trazado de linaje se convierten en la mejor aproximación para conocer la implicación de estas células en la biología del corazón sin una manipulación *ex vivo*. Hasta la fecha, solamente hay un estudio (muy reciente) de trazado de linaje del marcador Sca-1 donde se muestra la contribución de las células Sca-1+ en la tasa de renovación de los CM en el corazón adulto durante el proceso de homeostasis (Uchida et al., 2013).

2.6.1. Detección de cardiomiocitos YFP+ mediante inmunohistoquímica

Con el objetivo de estudiar la potencialidad *in vivo* de las células Bmi1+ para diferenciarse en cardiomiocitos, se llevó a cabo el análisis inmunohistoquímico de corazones Bmi1-YFP, 2, 6 y 12 meses después de la inducción con TM (Fig, 24A). Para la detección de los CM en los cortes histológicos se empleó la tinción frente a una proteína crucial del aparato contráctil del CM, la α -actinina sarcomérica (S α A). La co-expresión de S α A con YFP permitió la detección de CM que procedieran de la diferenciación de las células madre cardíacas Bmi1+, previamente inducidas.

Uno de los controles más minuciosos llevados a cabo en este trabajo ha sido la caracterización de una posible sub-población de CM adultos que expresaran Bmi1, y por tanto, pudieran enmascarar/contaminar los resultados obtenidos por una diferenciación directa de las células madre Bmi1+. El análisis inmunohistoquímico detallado de corazones Bmi1-YFP 5 días después de la inducción reveló la ausencia de CM SαA+YFP+. Por el contrario 2, 6 y 12 meses tras la inducción con TM sí se pudieron detectar CM YFP+ (Fig, 24B). La tinción con laminina confirmó la especificidad de la expresión de la proteína YFP en el interior celular (Fig, 24B).

El número de CM YFP+ aumentó sensiblemente entre los 2 y los 12 meses de la inducción pero se optó por no realizar una cuantificación mediante cortes histológicos para evitar errores en el conteo (Soonpaa et al., 2013). No se detectaron agrupaciones de CM YFP+ en ninguno de las cortes analizados.

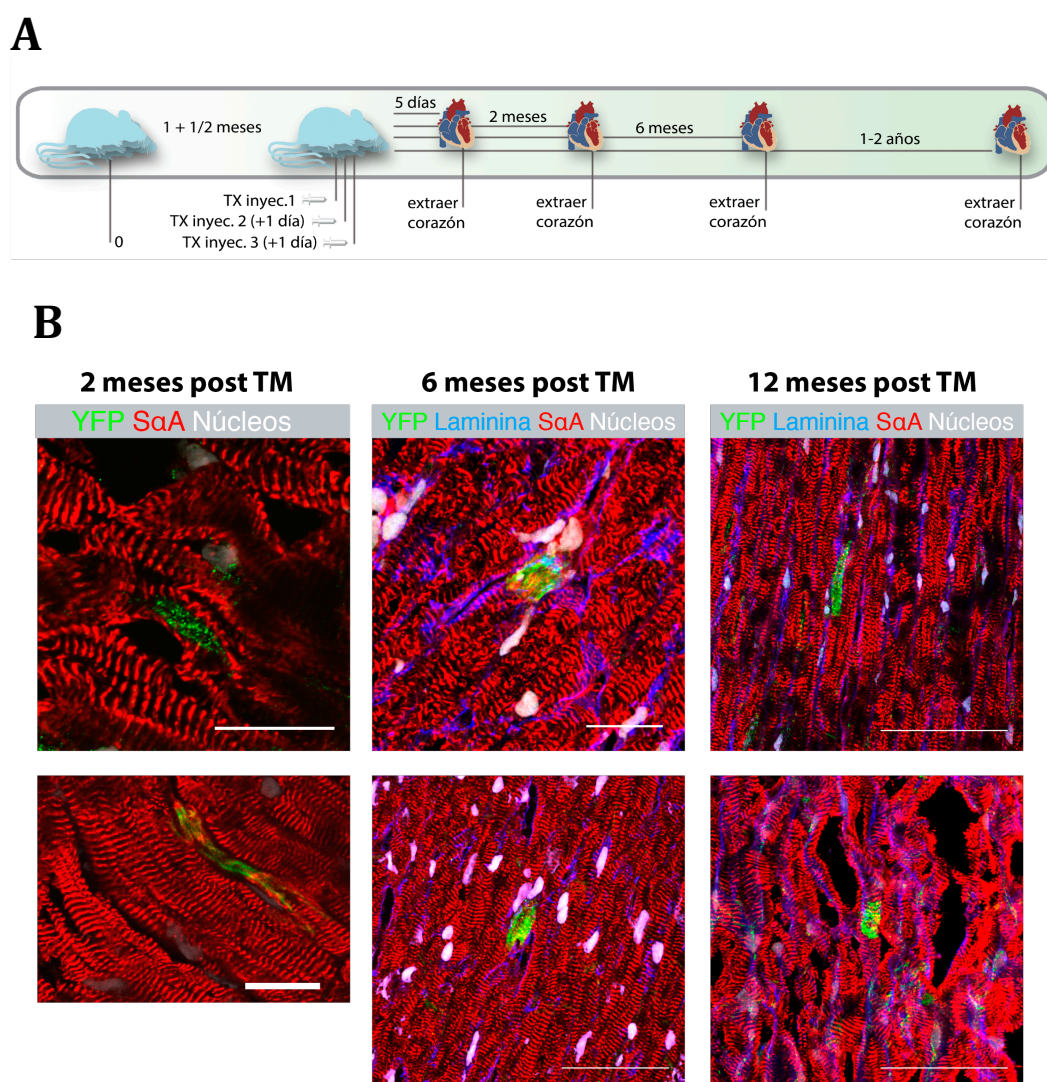


Figura 24. Contribución de las células Bmi1+ en la renovación de los cardiomiocitos adultos.

(A) Esquema del análisis de los corazones tras la inducción con TM llevado a cabo en la estrategia de trazado de linaje de las células Bmi1+. (B) CM YFP+SαA+ fueron detectados a lo largo de las secciones mediante un análisis inmunohistoquímico de corazones de animales Bmi1-YFP tras 2 (n=2), 6 (n=2) y 12 (n=2) meses de la inducción. La tinción con laminina destaca la integridad de la marca en el interior del CM. Escalas, 2 meses post TM, 20μm; escalas 6 meses post TM, panel superior 20μm, panel inferior 50μm; escalas 12 meses post TM, 50μm.

2.6.2. Aislamiento y análisis de cardiomiocitos YFP+ adultos

Dada la limitación de la inmunohistoquímica como técnica para el conteo de CM YFP+, y con el fin de ampliar el número de muestras y obtener la máxima cantidad de información posible, se aislaron los CM adultos para llevar a cabo un estudio por citometría de flujo e inmunocitoquímica. Para tal propósito, los corazones se digirieron mediante Liberase por perfusión retrógrada y se obtuvieron los CM mediante un proceso de sedimentación por gravedad (ver métodos). De la fracción de CM vivos, se analizó el porcentaje YFP+ mediante citometría de flujo.

Cuando se analizaron los corazones procedentes de animales 5 días después de la inducción con TM, no se encontraron CM YFP+ (≤ 1 CM YFP+ de 1.35×10^5 CM totales) (Fig, 25A). Sin embargo, a partir de 2 meses de la inducción, hasta 2 años (el tiempo que duró el estudio) se detectaron CM YFP+ (Fig, 25A). De hecho, los porcentajes se incrementaron desde un $3 \pm 0.2\%$, 2 meses después de la inducción hasta un $7.5 \pm 1.3\%$, 2 años después de la inducción (Fig, 25B).

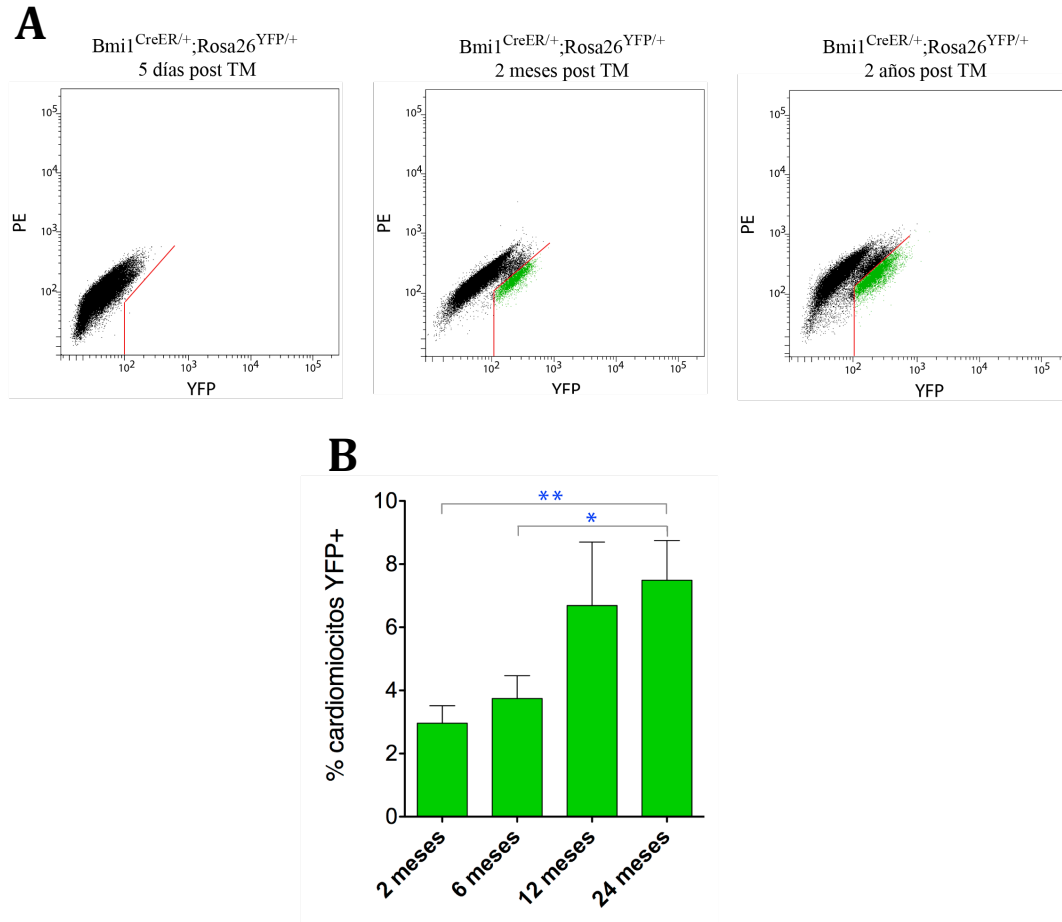


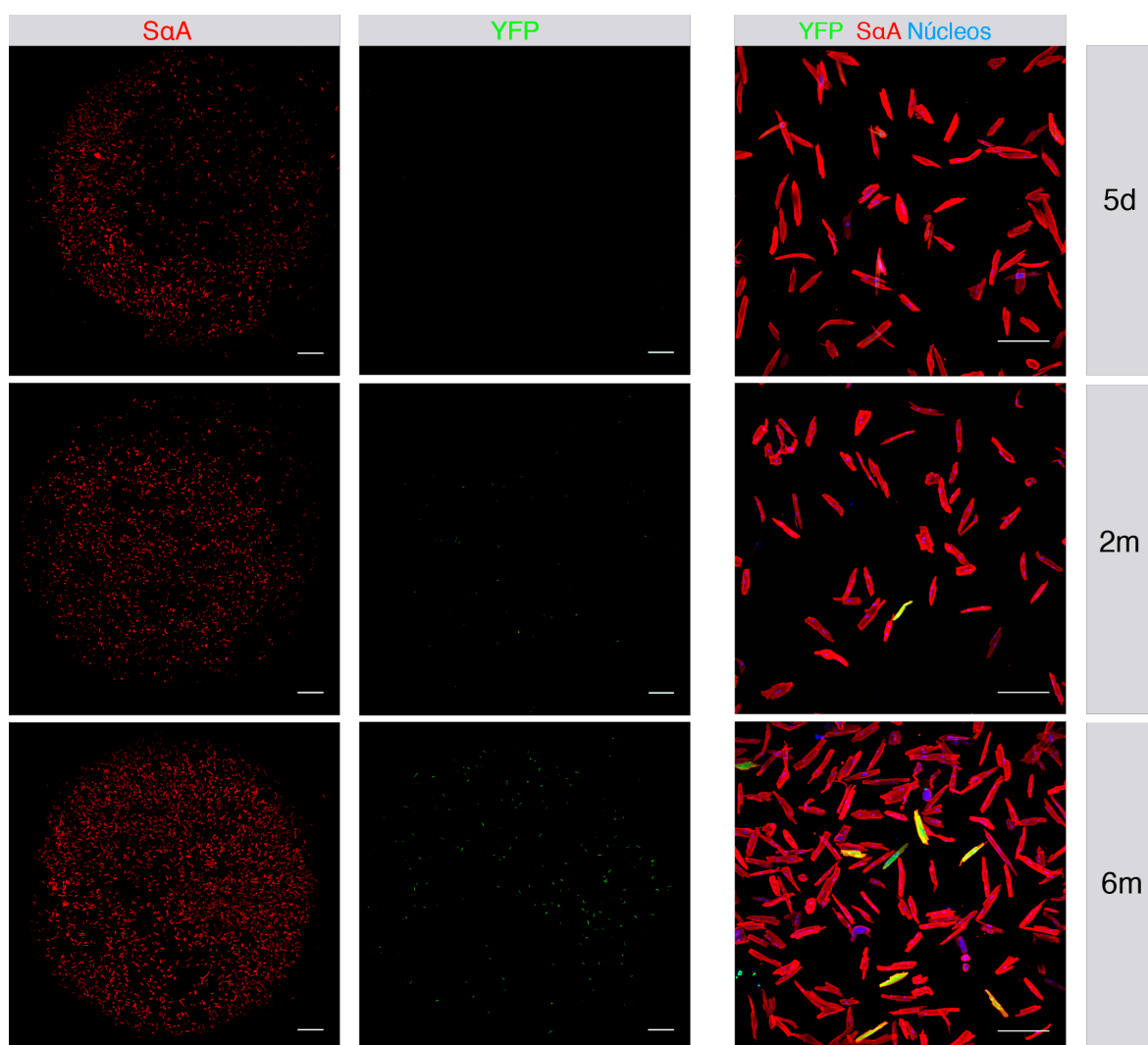
Figura 25. Aislamiento y caracterización de los cardiomiocitos YFP+ por citometría de flujo.

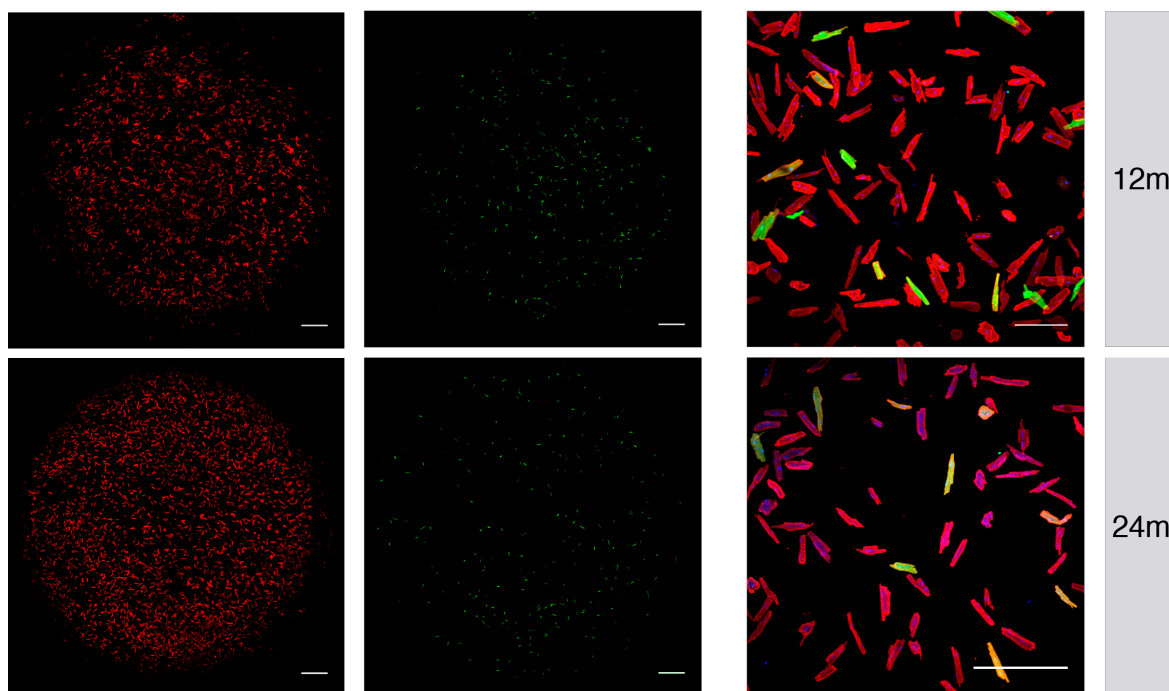
(A) Citometría de flujo de los CM aislados de corazones Bmi1-YFP 5 días después de la inducción (n=8), 2 meses (n=5) y 2 años (n=4). (B) El número de CM YFP+ se incrementa a lo largo del tiempo de estudio desde los 2 hasta los 24 meses posteriores a la inducción con TM: 2 meses (n=7), 6 meses (n=3), 12 meses (n=9) y 24 meses (n=11). El P-valor se calculó mediante un T-test con la corrección de Welch. *P-valor<0.05, **P-valor<0.01. Los datos representados se corresponden al conteo de los CM YFP+ mediante citometría de flujo e inmunocitoquímica de los CM aislados (media \pm SEM).

Para comprobar la naturaleza de los CM, tras su aislamiento de corazones de animales Bmi1-YFP, 2, 6, 12 y 24 meses después de la inducción, una parte de ellos fueron plaqueados en cristales previamente recubiertos con laminina. Una vez adheridos, los CM fueron fijados y teñidos frente a YFP y SαA. Como se muestra en la figura 26A, la pureza del aislamiento fue buena y, por tanto corroboramos que, las células enriquecidas tras el proceso de aislamiento, y analizadas por citometría eran CM. De la misma manera, el porcentaje de CM YFP+ analizados mediante inmunocitoquímica fue similar al obtenido mediante el citómetro de flujo, indicando que ambas técnicas daban lugar a resultados muy similares.

Se analizó el patrón de nucleación mediante microscopía confocal de los CM YFP+ y YFP- aislados de animales Bmi1-YFP después de la inducción con TM y plaqueados empleando la tinción con DAPI, SαA y YFP. Como se muestra en la figura 26B no se observaron diferencias en la nucleación entre los cardiomiocitos YFP+ y YFP-.

A





B

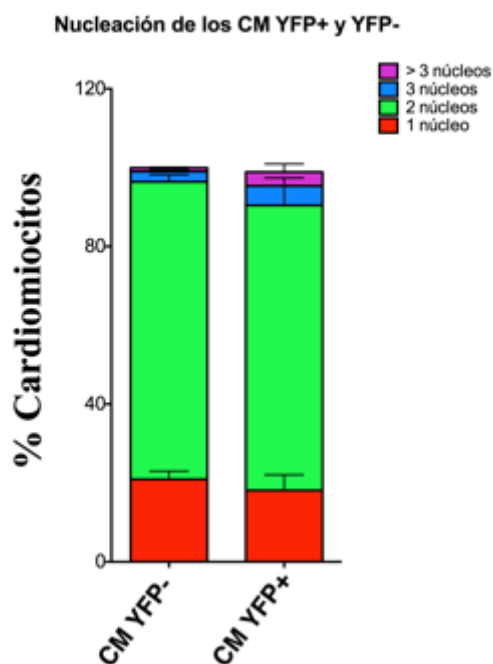


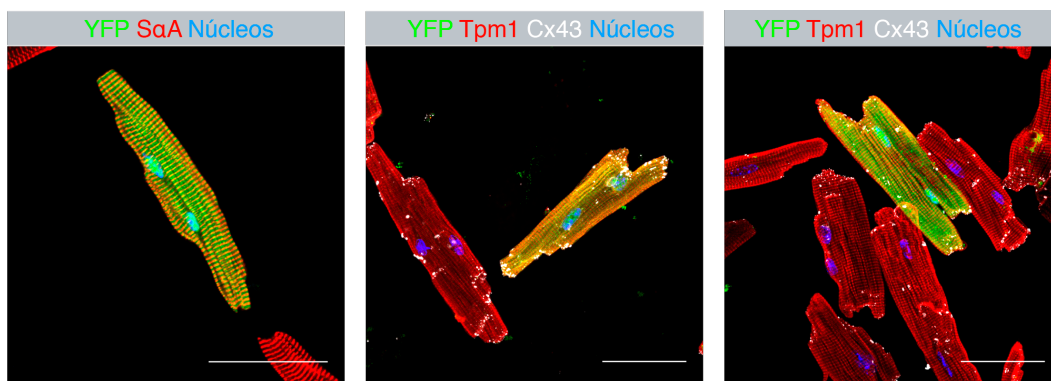
Figura 26. Aislamiento y análisis de los cardiomiocitos YFP+ por inmunocitoquímica.

(A) Inmunofluorescencia de CM adultos recién aislados 5 días (5d), 2 meses (2m), 6 meses (6m), 12 meses (12m) y 24 meses (24) después de la inducción con TM. La columna de la derecha representa la apariencia de los CM a mayor amplificación. Escalas, 1000µm excepto la columna de la dcha., 200µm. (B) Patrón de nucleación de CM YFP+ y YFP- aislados de animales a lo largo del proceso de homeostasis del órgano (n=7). Los datos se han representado como la media \pm la SEM.

Finalmente, con el objetivo de comprobar el grado de madurez de los CM YFP+, CM procedentes de animales inducidos y aislados a diferentes tiempos fueron plaqueados para realizar un estudio inmunocitoquímico de proteínas relacionadas con el aparato contráctil. El panel de marcadores elegido fue SαA, TPM1 y CX43. No se detectaron diferencias de expresión de las proteínas analizadas entre los cardiomiocitos YFP+ y en los YFP- (Fig, 27A).

Para profundizar en el grado de diferenciación de los cardiomiocitos YFP+ se llevó a cabo un estudio de flujo de calcio en CM aislados a diferentes tiempos después de la inducción. Los CM YFP+ recién aislados, fueron detectados mediante microscopía confocal y tras la tinción con Fluo-4 se evaluó el flujo de calcio (ver métodos) tanto en CM YFP+ como de los YFP-. No se detectó ninguna diferencia significativa respecto al patrón general de flujo de calcio entre ambas subpoblaciones (Fig, 27B). Por otra parte, en los CM recién aislados y mediante microscopía confocal (multifotón), para detectar específicamente los CM YFP+, se observó que estos latían de forma equivalente a los CM no marcados.

A



B

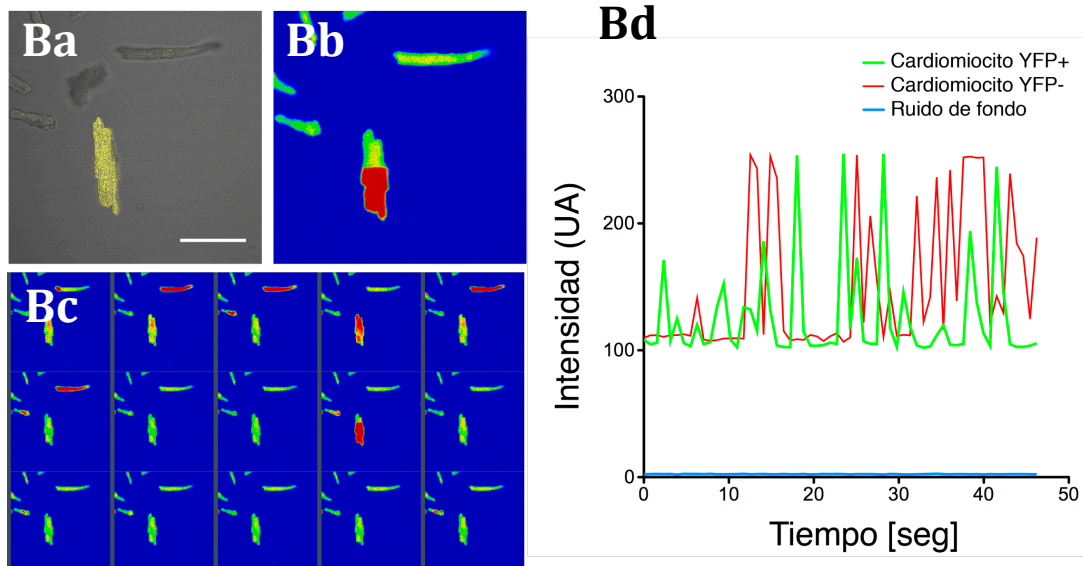


Figura 27. Aislamiento y caracterización de los cardiomiocitos YFP+ por inmunocitoquímica. Estudio del flujo de calcio.

(A) Expresión de las proteínas implicadas en la contractilidad en CM YFP+ y YFP-: α -actinina sarcomérica (S α A), Tropomiosina (TPM1) y Conexina 43 (CX43). Escalas, 50 μ m. (B) Estudio de las corrientes de calcio en CM YFP+ y YFP- recién aislados. (Ba) CM antes de la incorporación de calcio (los canales de fluorescencia y campo claro se encuentran solapados). (Bb y Bc) Las mismas células tras la incorporación de calcio. Las imágenes pseudocoloreadas muestran cambios en la concentración intracelular de calcio, capturado a intervalos de 8 ms. El color rojo representa elevadas concentraciones de calcio mientras que el azul, representa pequeñas o nulas. (Bd) Representación gráfica de las corrientes de calcio (UA, unidades arbitrarias).

Estos resultados permiten sugerir que no existe una población relevante de cardiomiocitos Bmi1+ en el corazón adulto. Sin embargo, durante la homeostasis del órgano, las células madre Bmi1+ son capaces de diferenciarse en cardiomiocitos totalmente maduros, con un patrón típico de expresión de proteínas contráctiles, capaces de latir.

3. Respuesta de las células madre Bmi1+ frente a daño cardíaco. Contribución en la regeneración del corazón

3.1. Respuesta de las células Bmi1+ en un modelo de daño cardíaco neonatal

Recientemente se ha publicado un trabajo que describe la capacidad del corazón neonatal del ratón para regenerar el ápex cuando éste se secciona (Porrello et al., 2011). El ápex constituye la porción más apical del órgano. Los autores muestran que cuando se lleva a cabo la resección del ápex en neonatos de un día de vida postnatal, los corazones regeneran completamente la porción reseccionada tras 21 días. Sin embargo, este potencial solamente acontece durante una corta ventana de tiempo, hasta el 7º día de vida postnatal. Si se realiza la resección apical en animales de 7 días de edad, un tejido fibrótico acaba sellando la herida, que no se regenera. Mediante un trazado de linaje los autores demuestran que el tipo celular encargado de regenerar el área dañada son los CM mediante su proliferación. Por tanto, hasta los 7 días de vida, el corazón neonatal de los ratones posee una sorprendente capacidad para restablecer completamente la fracción del ápex reseccionada, debido principalmente a la proliferación de los CM en esa ventana de tiempo (Porrello et al., 2011).

Con el objetivo de evaluar la respuesta de las células Bmi1+ ante este particular daño cardíaco y evaluar su capacidad para dar lugar a CM, se seccionó el ápex de corazones de animales neonatales Bmi1-YFP de 1 día de edad. Para ello, madres gestantes fueron inducidas con TM a 17.5 y 18.5 días de desarrollo embrionario (Fig, 28A).

Lo primero que se estudió fue la presencia o ausencia de células Bmi1+ en el corazón embrionario-neonatal de los animales. Para ello, los corazones de los neonatos Bmi1^{CreER/+};Rosa26^{YFP/+} fueron digeridos mediante colagenasa y analizados mediante citometría de flujo para detectar la presencia de la proteína YFP. Alrededor de un 0.3%±0.04% de las células cardíacas eran YFP+ (Fig, 28B).

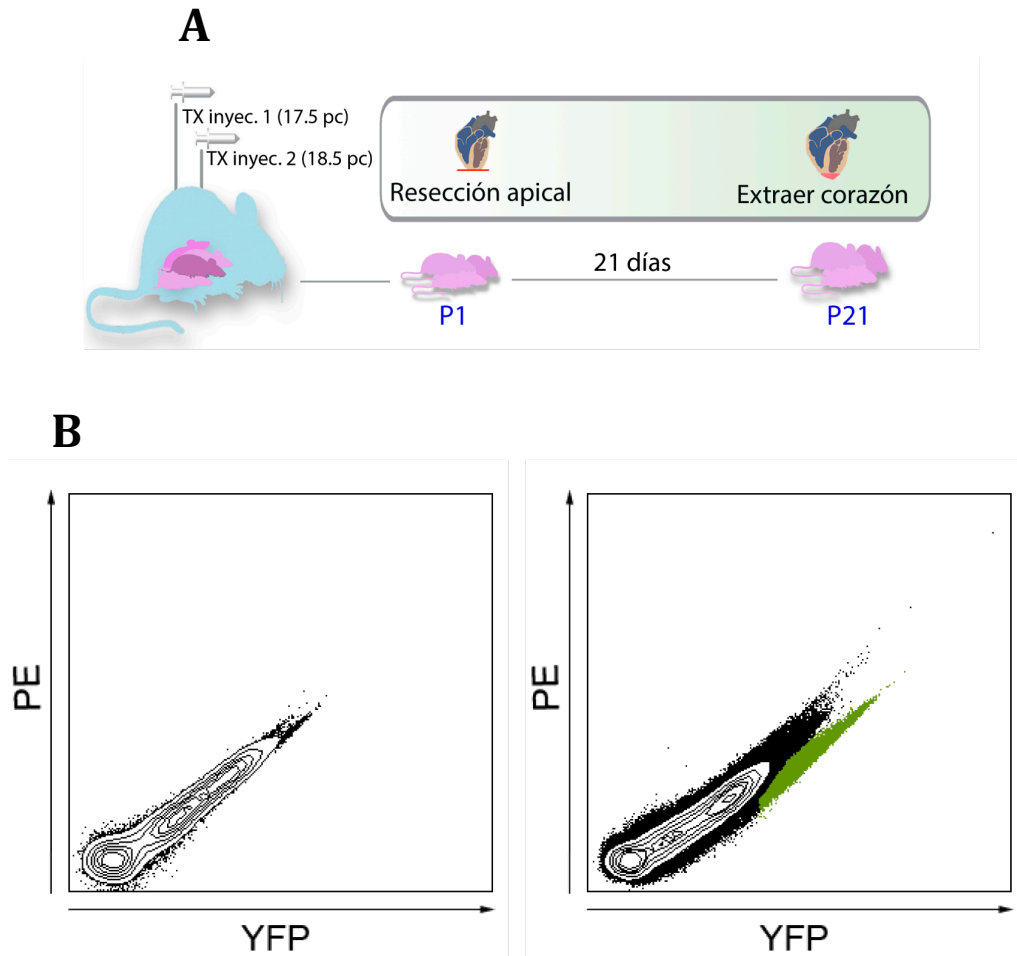


Figura 28. Expresión de Bmi1+ en el corazón neonatal.

(A) Esquema de la estrategia de resección apical de neonatos. (B) La fracción YFP+ (verde) en animales neonatales Bmi1-YFP de un día de edad, representa un $0.3 \pm 0.04\%$ de todas las células mononucleares del corazón ($n=8$). PE: Ficoeritrina.

Una vez confirmada la presencia de células Bmi1+ en el corazón neonatal, se procedió a llevar a cabo la resección apical en neonatos de un día de edad. Tras 1, 7 y 21 días de la operación, se obtuvieron los corazones para estudiar el proceso de regeneración descrito por Porrello y cols. Mediante una tinción de Hematoxilina-Eosina se evaluó la zona donde se había producido la resección y su evolución a lo largo del tiempo (Fig. 29A). Un día después de la operación se pudo observar como ya se había cerrado la herida mediante un coágulo de sangre. A los 7 días, el proceso de regeneración había comenzado y se notaba como el tejido nuevo iba reestructurando la parte reseccionada. A los 21, el ápex estaba totalmente restaurado.

Con el objetivo de evaluar la posible contribución de las células Bmi1+ en este escenario, 21 días después de la resección, los corazones fueron perfundidos con PBS e incluidos en OCT. Las criosecciones fueron teñidas con anticuerpos contra SαA y YFP para localizar CM YFP+. Al analizar el ápex después de 21 días, no pudimos detectar cardiomiocitos YFP+ ni en la zona regenerada ni en las áreas remotas al daño. Por el contrario, sí se pudieron detectar *clusters* de células YFP+ similares a los observados en los animales adultos en condiciones de homeostasis, tanto en aurículas como en ventrículos (Fig, 29B).

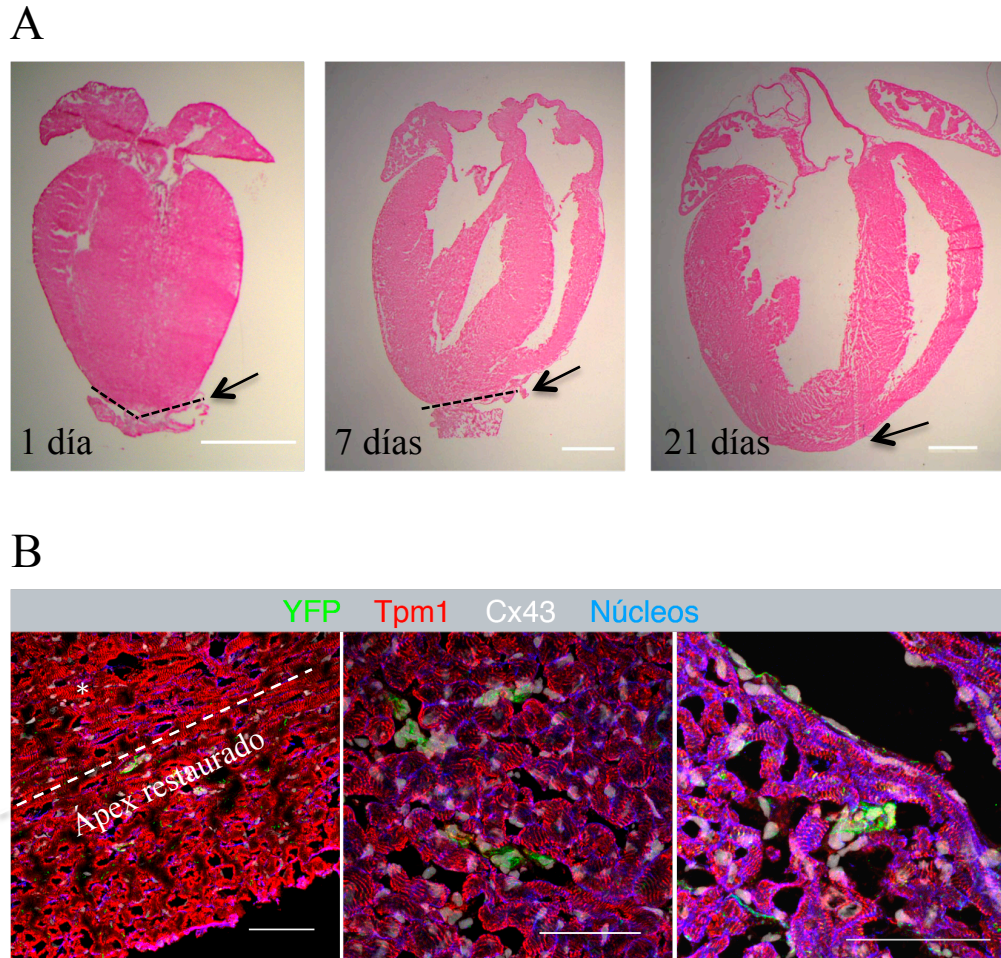


Figura 29. Respuesta de las células Bmi1+ en un modelo de daño cardíaco neonatal.

(A) Tinción de Hematoxilina-Eosina de corazones Bmi1-YFP neonatales 1, 7 y 21 después de la resección apical. Las líneas punteadas delimitan el plano de resección. Las flechas indican el sitio de daño. Escalas, 1000µm. (B) Tras la resección apical de los corazones neonatales (n=3), los *clusters* YFP+ (asterisco blanco) se detectaron cerca del plano de resección (delimitado por una línea blanca punteada en el panel izdo.) mientras que otros se detectaron en el ventrículo (panel central) y en la aurícula (panel dcho.). Escalas, 50µm.

Conjuntamente estos resultados permiten sugerir que las células Bmi1+ se encuentran en el corazón neonatal pero no juegan un papel relevante en el proceso de regeneración tras una resección apical.

3.2. Papel de las células madre Bmi1+ en un modelo de infarto agudo de miocardio en animales adultos

La consecuencia de un infarto de miocardio es la inmediata privación de oxígeno en la zona irrigada por la arteria coronaria obstruida. Tras el proceso de inflamación que acontece a la muerte celular, tiene lugar la remodelación ventricular debida a la acción de los fibroblastos. Este proceso de remodelado finaliza con la formación de una cicatriz que no es reemplazada por tejido nuevo y por tanto, el corazón pierde funcionalidad llevando en algunos casos a la muerte.

¿Cuál es la capacidad del corazón de respuesta ante esta situación?, ¿qué tipos celulares contribuyen en la formación de nuevos cardiomiocitos? Con el objetivo de determinar el papel de las células Bmi1+ en un proceso de daño cardíaco en el corazón adulto, se adoptó el modelo de ligación permanente de la arteria coronaria izquierda para producir un infarto agudo de miocardio.

3.2.1. Estudio del transcriptoma de las células madre Bmi1+ tras un infarto agudo de miocardio (IAM)

Para comprender cómo se comportan las células Bmi1+ ante una isquemia, decidimos analizar su patrón de expresión génica tras haberse producido el daño. Para ello, cinco días después de la inducción, los animales fueron operados: se les produjo una ligación permanente de la coronaria izquierda. Cinco días después de la operación, los corazones se digirieron y se sortearon las células YFP+ procedentes de los animales infartados (Fig, 30A). Al comparar el número de células Bmi1+ obtenidas a los 5 días del infarto *versus* las células en condiciones de homeostasis, se pudo apreciar un incremento significativo en el número de células YFP+ tras el daño cardíaco (Fig, 30B).

Con el fin de analizar el transcriptoma de las células, se extrajo el ARN de cuatro réplicas biológicas compuestas cada una ellas de las células obtenidas de 2-3 animales. Los resultados obtenidos del RNAseq se compararon con los datos del transcriptoma procedente de células Bmi1+ de corazones no infartados con el fin de identificar los transcritos diferencialmente expresados en ambas condiciones: la fisiológica y la isquémica.

El análisis de ambas condiciones reveló una expresión diferencial de más de 5500 genes entre las células Bmi1+ no infartadas y las sometidas a un daño isquémico. El *heat map* mostó una clara separación de ambas condiciones (Fig, 30C). Mediante el estudio con el *software Ingenuity Pathway* se observó que tras un proceso de infarto de miocardio las células Bmi1+ presentaban una regulación al alza de genes relacionados con el crecimiento celular y proliferación (1574), con la muerte celular y supervivencia (1533), con el movimiento celular (1001) y con aquellos genes relacionados con el ciclo celular (727) (Fig, 30D).

La activación de estas rutas vino acompañada por una fuerte regulación a la baja de genes clave implicados en el mantenimiento de un estado multipotente, tales como Oct-4 y Dppa5 (Fig, 31). Además de genes relevantes en funciones clave embrionarias, genes de las rutas de Notch, de contracción muscular cardíaca y potencial de calcio también se encontraron significativamente regulados a la baja en la población Bmi1+ tras el infarto cardíaco (Fig, 31). Estos resultados sugieren un cambio en el perfil de expresión génica de rutas relacionadas con proliferación y diferenciación en las células Bmi1+ tras un daño isquémico.

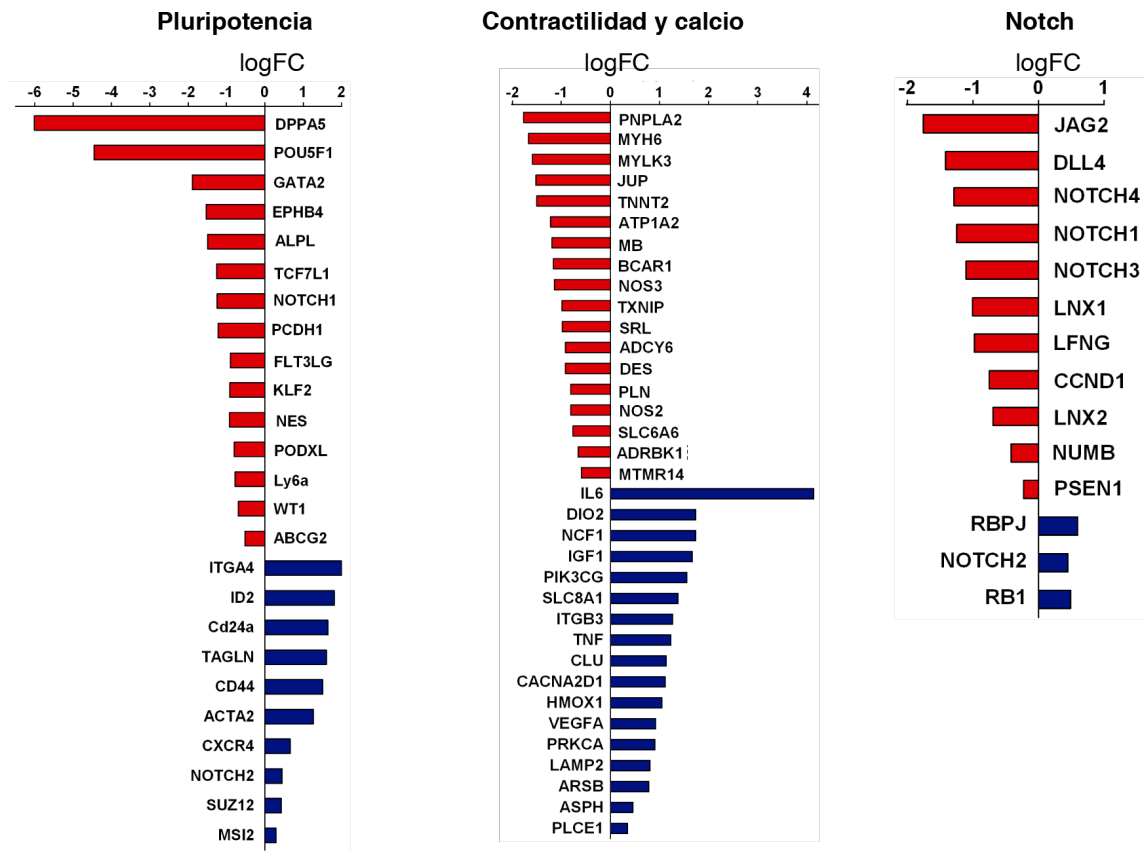


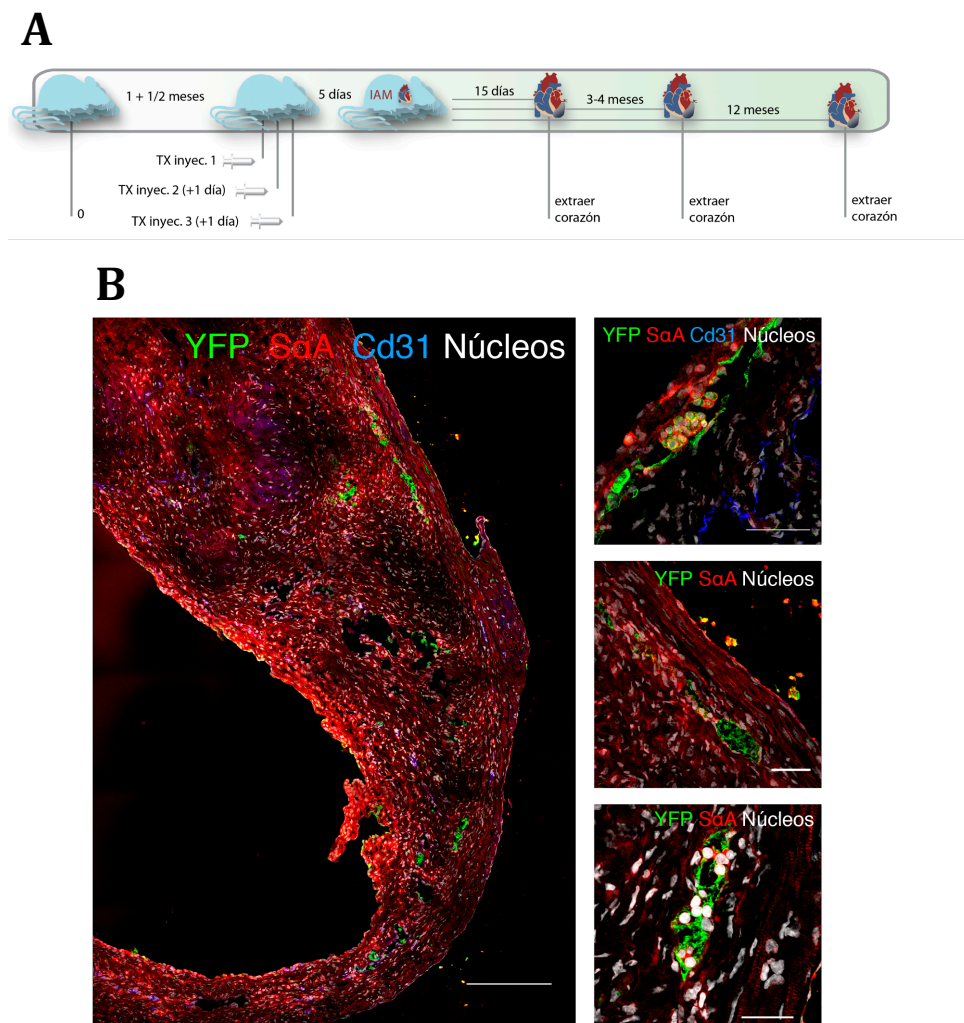
Figura 31. Estudio del transcriptoma de las células Bmi1+ después de un infarto agudo de miocardio.

Expresión diferencial de genes implicados en pluripotencia, la ruta de Notch y genes relacionados con contractilidad y flujo de calcio. Los genes se clasifican según se encuentran regulados al alza (azul) o a la baja (rojo) en las células Bmi1+ tras 5 días después del IAM por comparación con la células Bmi1+ obtenidas de corazones no infartados.

3.2.2. Trazado de linaje de las células Bmi1+ en un modelo de infarto agudo de miocardio

Dado que Bmi1 define una población de células, en el corazón adulto, que en condiciones fisiológicas es capaz de contribuir en la formación de nuevos CM a lo largo de la vida del animal, se decidió llevar a cabo un estudio de trazado de linaje de las células Bmi1+ en un modelo de IAM (ligadura de la arteria coronaria izquierda). Se quiso evaluar si, después de un daño cardíaco en el corazón adulto, las células Bmi1+ eran capaces de contribuir en la formación de nuevos CM en mayor medida que en condiciones fisiológicas (Fig. 32A).

Animales Bmi1-YFP de 6-8 semanas de edad, fueron inducidos con TM y 5 días después se les provocó un infarto por ligadura permanente de la coronaria izquierda. 15 días después del IAM, los animales fueron sacrificados y los corazones fueron perfundidos con PBS y embebidos en OCT con el fin de llevar a cabo un estudio inmunohistoquímico. En el área de infarto se detectaron células YFP+ agrupadas en *clusters*, similares a las encontradas en condiciones fisiológicas, aunque formadas por un mayor número de células (Fig. 32B). En la zona del borde del infarto se detectaron CM YP+ (Fig. 32C).



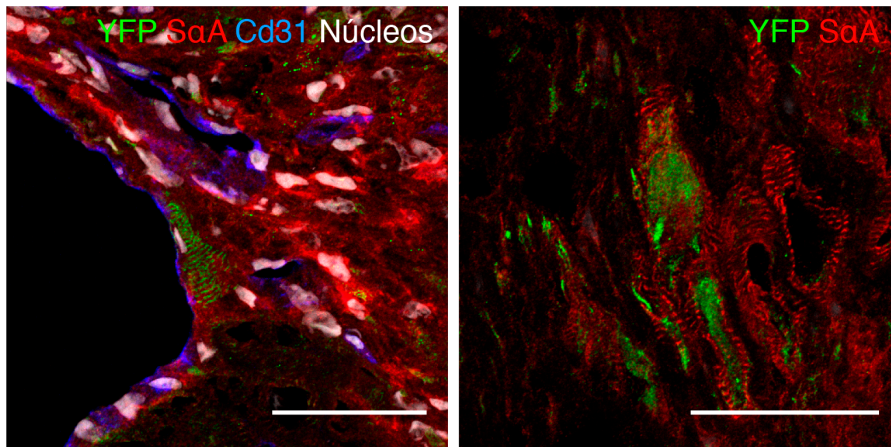
C

Figura 32. Contribución de las células Bmi1+ en la reparación del corazón adulto después de un infarto de miocardio.

(A) Esquema de la estrategia de trazado de linaje de la células Bmi1+ después de un infarto agudo de miocardio en el corazón adulto de animales Bmi1-YFP. (B) Sección transversal de un corazón infartado Bmi1-FP después de 15 días del IAM (panel izdo.) y detalle de los *clusters* YFP+ (n=2) localizados dentro de la zona infartada. Escala, 200µm (panel izdo.); escala panel dcho. superior, 50µm; escalas paneles dcho. central e inferior, 20µm. (C) CM YFP+ detectados en el borde del área de infarto 15 días después del daño. Escalas, 20µm.

Tres meses después del infarto, no se pudieron detectar células YFP+ en el área del infarto (Fig, 33A). En este tiempo de análisis, el número de CM YFP+ detectados, tanto en los alrededores del infarto, como en las zonas remotas fue notablemente superior con respecto a los 15 días (Fig, 33B).

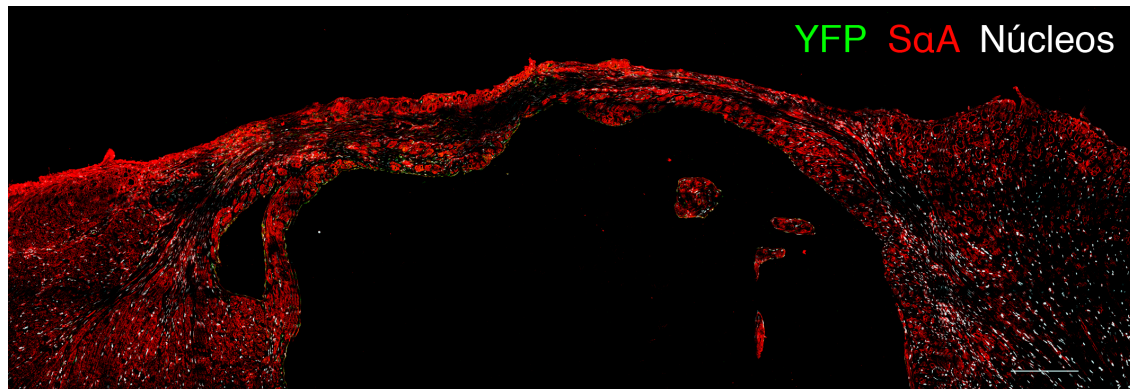
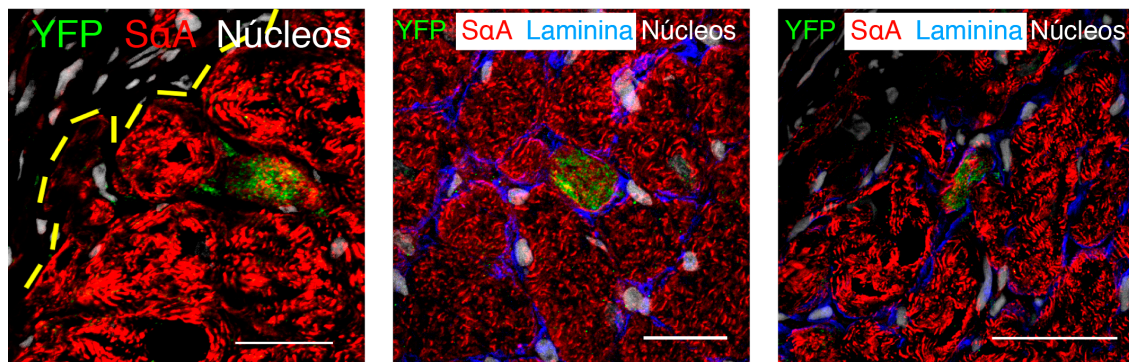
A**B**

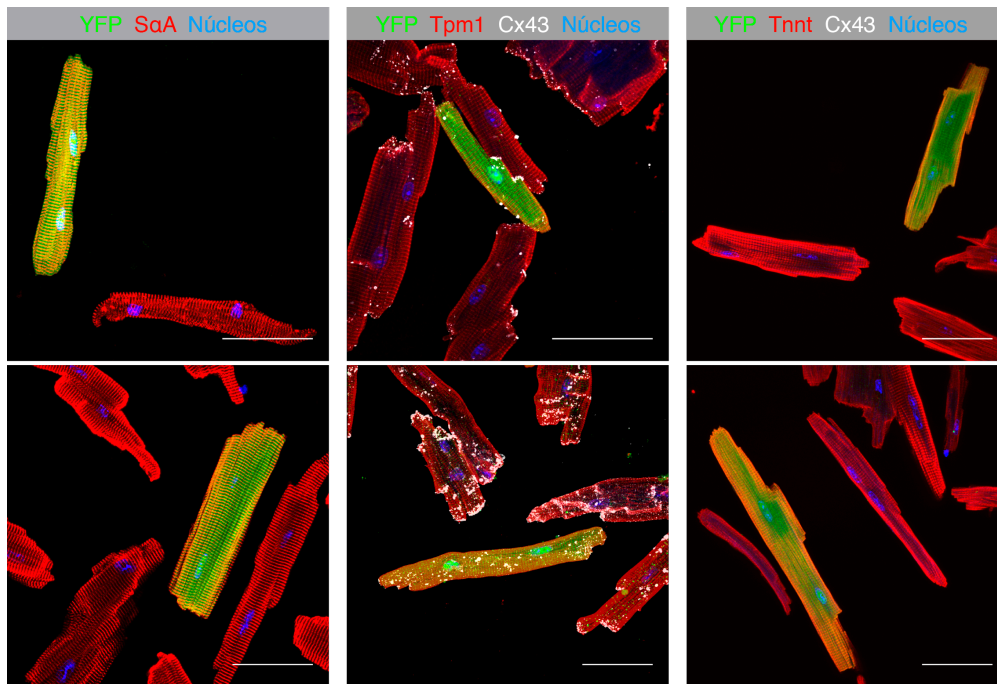
Figura 33. Contribución de las células Bmi1+ en la reparación del corazón adulto después de un infarto de miocardio.

(A) Detalle de la sección transversal de un corazón infartado Bmi1-YFP después de tres meses del daño. Escala, 200 μ m. (B) CM YFP+ 3 meses después del infarto, localizados principalmente en el borde del área dañada (línea punteada amarilla) (n=3) aunque también en zonas remotas. Escalas, 20 μ m.

Para corroborar la capacidad de diferenciación de las células Bmi1+ hacia CM después de un infarto de miocardio, a la vez que poder llevar a cabo un análisis en profundidad de los CM YFP+, 4 meses después del IAM, los animales fueron sacrificados y los CM aislados y plaqueados como se describe en homeostasis. El conteo de los cardiomiocitos YFP+ por inmunocitoquímica reveló que el porcentaje era de $12.4 \pm 2.5\%$. Cuando se analizaron los CM de animales un año después del infarto el porcentaje ascendió a $18.4 \pm 4.6\%$. Estos porcentajes eran claramente superiores a los obtenidos en condiciones fisiológicas (Fig. 34A).

Al analizar un panel de proteínas de contractilidad en los cardiomiocitos obtenidos 4 meses después del infarto, mediante inmunocitoquímica, no se observaron diferencias en el perfil de expresión entre los CM YFP+ y YFP-, sugiriendo una diferenciación completa de las células Bmi1+ en cardiomiocitos maduros (Fig. 34B).

A



B

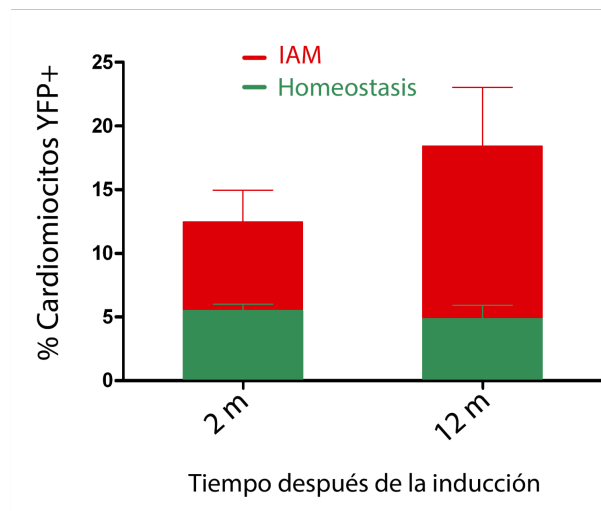


Figura 34. Contribución de las células *Bmi1*⁺ en la reparación del corazón adulto después de un infarto de miocardio.

(A) CM adultos aislados 4 meses después del IAM. Los cardiomiocitos YFP⁺ expresan proteínas cardíacas relacionadas con la contractilidad celular, incluyendo SαA, TPM1 y TNNT. Escalas, 50μm. (B) El número de CM YFP⁺ se incrementa en los corazones adultos infartados (n=4, 4 meses tras IAM y n=2 tras 1 año del infarto) comparados con los no infartados (n=4, 4 meses tras la inducción con TM y n=4, tras 12 meses de la inducción), analizados en el mismo punto después de la inducción con TM. Los datos representados son la media ± SEM.

En conjunto estos resultados indican que las células madre cardíacas Bmi1⁺ son capaces de cambiar su patrón de expresión génica, activarse y diferenciarse después de un daño cardíaco en el corazón adulto de mamíferos, contribuyendo activamente en el proceso de reparación del órgano.

DISCUSIÓN

El afán de conocimiento del ser humano, le ha llevado a cuestionarse prácticamente todo lo que le rodea. Tan solo hace 61 años del descubrimiento del ADN, descubrimiento que cambió la forma de entender la biología moderna. Desde este hallazgo hasta hoy, la evolución en el entendimiento y profunda comprensión de la biología ha sido extraordinaria y, uno de los campos que más se ha beneficiado de este vertiginoso avance, ha sido la biomedicina. ¿Podemos frenar el envejecimiento de nuestros órganos para que la vida dure un suspiro más?, ¿es posible potenciar la regeneración de un órgano para mejorar su función?

En este contexto, las células diferenciadas de un tejido tienen una vida finita. Por este motivo, el organismo debe contar con un sistema que le permita renovar los tejidos ya que de otra manera éstos tendrían una vida media muy corta. ¿Qué mecanismo principal es el encargado de rejuvenecer al órgano y restaurarlo tras un daño? Las células madre adultas. Estas células, que son escasas en número, tienen unas propiedades intrínsecas que las hacen muy diferentes al resto de células que conforman el tejido. Entre ellas, quizás la más importante sea su capacidad de auto-mantenimiento a lo largo de la vida del animal sin perder sus características, a la vez que su progenie es capaz de diferenciarse. Esta jerarquía de diferenciación nos aproxima a la perspectiva de la longevidad de los órganos. De esta manera, hay determinados órganos donde el papel de las células madre es clave, tanto para su mantenimiento como para la recuperación después de un daño, como es el caso de la piel (Blanpain & Fuchs, 2006) o el intestino (Barker et al., 2007; Sangiorgi & Capecchi, 2008). Sin embargo, no todos los órganos presentan una tasa de renovación y una actividad celular tan elevada. Tal es el caso de los órganos considerados hasta hace pocos años como terminalmente diferenciados, con una tasa de recambio celular muy baja: el cerebro y el corazón.

1.- EL CORAZÓN COMO ÓRGANO DINÁMICO: Homeostasis-regeneración. ¿Cómo detectarla? ¿Qué tipo celular?

La existencia de una hipotética regeneración cardíaca ha sido intensamente estudiada a la vez que controvertida y debatida durante más de 150 años (Carvalho & de Carvalho, 2010). Pero, ¿por qué tal controversia? La respuesta podría ser relativamente sencilla. El corazón es uno de los órganos con menor capacidad regenerativa del cuerpo, de tal manera que si sucede, su tasa debe ser muy baja en comparación con la capacidad demostrada por otros órganos como la piel o el intestino. La pregunta que habría que plantearse sería: ¿cuál es el potencial real intrínseco regenerativo del corazón y qué tipo celular es el encargado de estos procesos?

Sin embargo, esta limitada capacidad regeneradora del corazón no acontece en otras especies inferiores como peces o anfibios. Tras la resección apical del corazón del pez cebra, éste es capaz de regenerarlo completamente (Poss et al., 2002). ¿Por qué el corazón adulto del pez cebra retiene una potencialidad para regenerarse a lo largo de toda su vida mientras que en mamíferos esta

potencialidad se pierde? Existen varias consideraciones relacionadas con la biología del órgano y de los cardiomiocitos del pez cebra que difieren del sistema de mamíferos que deben ser tenidos en cuenta. Así pues, el corazón de los mamíferos está compuesto por cuatro cámaras, es mucho más grande y las funciones llevadas a cabo están sometidas a una gran presión respecto a las dos cámaras que componen el corazón del pez cebra. Pero quizás una de las razones más importantes por la que el corazón del pez cebra puede regenerarse sea porque sus cardiomiocitos proliferan ya que la mayoría de estas células permanecen diploides y mononucleadas (Poss, 2007). Por el contrario, en mamíferos, la mayoría de los cardiomiocitos incrementa el contenido de ADN de manera estadio-dependiente, así, en ratón, durante la primera semana postnatal de vida, la mayoría de los cardiomiocitos llevan a cabo una ronda final de replicación del ADN seguida por una división nuclear sin citocinesis dando lugar a cardiomiocitos binucleados; de forma que en adultos hasta el 82% de los cardiomiocitos son binucleados (Li et al., 1996).

¿Que situación nos encontramos en condiciones fisiológicas, es decir, en condiciones de homeostasis?, ¿se puede seguir considerando al corazón como un órgano totalmente postmitótico? La investigación llevada a cabo durante las últimas décadas, soportada por un amplio abanico de metodologías, apoya ampliamente el hecho de que el corazón adulto de mamíferos conserva cierta capacidad para el reemplazamiento de sus cardiomiocitos a lo largo de la vida del órgano. Sin embargo, sigue existiendo una fuerte controversia acerca de la relevancia de esta capacidad endógena. Esta controversia se ha visto favorecida por las discrepancias surgidas a cargo de las diferentes metodologías empleadas para determinar la proliferación celular así como la identificación del tipo celular proliferante. Diversos estudios han sugerido que el corazón humano sería recambiado en su totalidad en 3 años, mientras que si acontece un infarto, lo haría en 3 semanas (Kajstura et al., 1998; Kajstura et al., 2010; Beltrami et al., 2001). Por el contrario, otras investigaciones empleando la información procedente de la datación con C¹⁴ (Bergmann et al., 2009) y estudios cuantitativos de síntesis de ADN usando medidas autoradiográficas de incorporación de timidina tritiada (Soonpaa & Field, 1997), apuntan a una tasa de reemplazamiento anual de cardiomiocitos del 1% o incluso menor. Tales discrepancias han sumergido al campo en una profunda confusión a lo largo de décadas acerca de cuál sería la tasa real de recambio en condiciones fisiológicas. Para dilucidar estas diferencias es necesario comprender la verdadera magnitud de la renovación del corazón de mamíferos y ser muy críticos con las fuentes de sesgo inherentes a las metodologías empleadas.

A pesar de tales discrepancias, se ha aceptado el hecho de que el corazón adulto no es un órgano terminalmente diferenciado y que, efectivamente, posee una cierta capacidad regenerativa endógena que le permite reemplazar los cardiomiocitos a lo largo de la vida.

¿Cuál sería la fuente celular de los nuevos cardiomiocitos generados durante la vida del animal? Básicamente se han propuesto tres fuentes principales: a) la división de cardiomiocitos adultos preexistentes (Kajstura et al., 1998; Malliaras et al., 2013; Senyo et al., 2013; Zhang et al., 2010), b) la amplificación de cardiomiocitos de-diferenciados (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010) y c) la diferenciación de células progenitoras cardíacas (Hsieh et al., 2007). Se han encontrado evidencias de los tres procesos en diferentes especies y bajo diferentes condiciones. Sin embargo, hay numerosos estudios que sugieren que los dos primeros fenómenos serían eventos muy raros que suceden esporádicamente, por lo que los nuevos cardiomiocitos deben surgir principalmente de la diferenciación de un reservorio de células progenitoras o células madre cardíacas residentes en el órgano (Soonpaa & Field, 1997, 1998).

El corazón contiene un compartimento celular indiferenciado con propiedades cardiomiogénicas (Beltrami et al., 2003), pero el número de tipos de progenitores cardíacos que presentan características particulares y excluyentes, identificados hasta la fecha, es controvertido (Anversa et al., 2006). Estas discrepancias son debidas, en parte, a la ausencia de marcadores específicos para definir el compartimento de células madre en el corazón adulto de los mamíferos. Parece poco probable que un órgano con una capacidad regenerativa tan limitada, sea capaz de albergar varias poblaciones distintas, como se han descrito, de células progenitoras con características no solapantes (Laflamme & Murry, 2011; Mercola et al., 2011). Es más probable que las diferentes poblaciones descritas hasta la fecha representen diferentes estadios de desarrollo y/o fisiológicos de una única población, quizá heterogénea (Ellison et al., 2010).

Esta confusión a la hora de determinar qué marcador define de manera conclusiva la célula madre cardíaca ha sumido al campo en un considerable escepticismo: no existe hoy en día consenso acerca de cómo identificar, de manera precisa este, tipo celular así como esclarecer el papel que pueden desempeñar *in vivo* en la biología del órgano.

Para arrojar luz en esta controversia, se debería recurrir a un trazado de linaje condicional con el fin de poder detectar las células madre cardíacas *in situ*, sin su cultivo *ex vivo* y poder estudiar cómo un determinado tipo celular, contribuye al reemplazamiento de los cardiomiocitos durante la homeostasis o en respuesta a un daño. De hecho, los mecanismos moleculares implicados en la auto-renovación y diferenciación de las células madre cardíacas hacia los diversos linajes cardíacos todavía no han sido totalmente definidos (Hansson et al., 2009).

2.- Bmi1-CSCs EN EL CONTEXTO DE OTRAS POBLACIONES DE CÉLULAS MADRE CARDIACAS

La clave para poder identificar a una célula madre es detectar y definir sus propiedades esenciales y particulares. En este sentido, aquellos genes implicados en el control del destino celular adquieren

particular relevancia a la hora de encontrar marcadores que verdaderamente resuman y definan las propiedades de las células madre. Los componentes de la familia del grupo Polycomb, ampliamente conocidos por ser elementos epigenéticos encargados de silenciar determinados genes, han demostrado estar asociados con el auto-mantenimiento y la diferenciación de las células madre de diversos tejidos (Papp & Muller, 2006). De todos los miembros de la familia Polycomb, uno de los que tiene un papel más principal y está más relacionado con la identificación de éstos tipos celulares en diversos órganos es Bmi1. Con la premisa de que Bmi1 está implicado en el auto-mantenimiento y diferenciación de diversas poblaciones de células madre adultas, se decidió apostar por su papel como elemento clave en la definición de las cardíacas.

Empleando el modelo de ratón Bmi1 *knock-in*, desarrollado por el Dr. Mario Capecchi, inducible bajo la administración de tamoxifeno (Sangiorgi & Capecchi, 2008) se pudo detectar una población de células Bmi1+ en el corazón adulto del ratón ($2.7 \pm 0.2\%$; $7.9 \times 10^4 \pm 5.9 \times 10^3$ células Bmi1+/corazón). Al realizar un análisis de marcadores de superficie mediante citometría de flujo se pudo determinar que las células cardíacas Bmi1+ eran CD31+, Sca-1+ pero c-kit y CD45 negativas. En los últimos años, la capacidad de los marcadores de superficie para ser utilizados en la definición final de una población está siendo cuestionada. Así pues, aunque la expresión del marcador de superficie CD31 ha sido tradicionalmente asociado al linaje endotelial, sin embargo, últimamente, se han descrito otras poblaciones progenitoras cardíacas, como los mesangioblastos, que expresan CD31 y que, por el contrario, presentan una capacidad cardiomiogénica elevada (Galvez et al., 2008).

Siendo c-kit un marcador típicamente considerado en el estudio de las células progenitoras cardíacas resulta llamativo que las células Bmi1+ carezcan de su expresión. El potencial de las células cardíacas c-kit+, inicialmente muy prometedor, parece irse comprometiendo a medida que se investiga con mayor profundidad el papel de este gen en la biología de las células progenitoras cardíacas. A pesar de que hay estudios que apuntan a que las células cardíacas c-kit+ trasplantadas en modelos de infarto de miocardio contribuyen en la regeneración del miocardio (Bearzi et al., 2007); otros estudios siguen un papel mucho más secundario (Tang et al., 2010). De hecho, estudios centrados en el potencial de las células c-kit+ en ratón han demostrado la ausencia de capacidad de estas células para diferenciarse en cardiomiocitos tanto *in vitro* como *in vivo*, tras ser trasplantadas en corazones infartados (Zaruba et al., 2010). Otro estudio empleando un modelo transgénico reportero demostró que las células cardíacas c-kit+ no se diferenciaban en cardiomiocitos mientras después de inducir un daño cardíaco, había una re-expresión del marcador en cardiomiocitos preexistentes (Kubo et al., 2008).

La gran mayoría de las células Bmi1+ son Sca-1+ (>90%), pero tan sólo un pequeño porcentaje de la fracción Sca-1+ es Bmi1+ ($5.7 \pm 0.4\%$). Este resultado indica que la población Bmi1+ se corresponde con una pequeña fracción de la población total Sca-1 detectada en el corazón adulto.

Por otra parte, la ausencia de la expresión de CD45 en las células Bmi1+ permite descartar una procedencia hematopoyética de las células.

3.- ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MADRE Bmi1-CSCs *IN VITRO*.

La ausencia de marcadores específicos y fiables, junto con la imposibilidad de analizar las características intrínsecas de las células en su ambiente, *in vivo*, ha dado lugar al desarrollo de técnicas para evaluar el potencial y las características de las poblaciones progenitoras cardíacas *in vitro*. Así, se han desarrollado métodos de diferenciación *in vitro* para evaluar su capacidad de diferenciación a los distintos linajes y por tanto su multipotencia. Diferentes métodos se han desarrollado para evaluar su capacidad de auto-renovación y auto-mantenimiento. Hay que tener en cuenta que todos estos métodos intentan evaluar la capacidad de las células fuera de su ambiente. Por otra parte, la manipulación en cultivo de las células progenitoras cardíacas ha llevado a resultados dispares entre grupos de investigación, incluso trabajando con el mismo tipo celular. Las diferentes metodologías desarrolladas para su extracción y las diferentes condiciones de cultivo empleadas han podido jugar un papel clave en esta discordancia. Es por ello que en la caracterización *in vitro* de las células cardíacas Bmi1+ se ha optado por trabajar con la mínima manipulación evitando un cultivo *ex vivo* prolongado.

Cuando se analiza el potencial de diferenciación de las células Bmi1+, recién aisladas, éstas muestran una clara determinación para diferenciarse hacia el tejido endotelial y vascular mientras que, aunque presentan una tendencia a diferenciarse hacia cardiomiocitos, ésta se encuentra más limitada. Estos resultados coinciden con los obtenidos por muchos grupos de investigación que han sometido a sus poblaciones progenitoras cardíacas a protocolos dirigidos de diferenciación (Beltrami et al., 2003; Chong et al., 2011; Galvez et al., 2008; Oh et al., 2003). La capacidad de las células Bmi1+ se ve condicionada ampliamente por el ambiente en el que se encuentran. Cuando se obtiene la población Sca-1+ del corazón de animales inducidos *knock-in* Bmi1, la proporción de células Bmi1+ que se diferencia hacia estructuras tubulares sencillas CD31+ es muy elevada, integrándose perfectamente con los tubos generados por las células Sca-1+. Sin embargo, cuando se aplican las mismas condiciones de cultivo a poblaciones formadas exclusivamente por células Bmi1+, estas estructuras tubulares son más escasas pero se organizan de una manera mucho más compleja e intrincada; confluyen y se interconectan entre sí para dar lugar a nudos complejos.

En ambos cultivos, hay una fracción de células que se diferencia hacia musculatura lisa con la expresión de marcadores tempranos y tardíos de linaje. Resulta interesante que esta fracción celular

se dispone rodeando los tubos endoteliales, yuxtapuesta a ellos y, que en el caso del cultivo de las células Bmi1+, el desarrollo de esta fracción muscular está más extendida y se encuentra en una conexión más íntima con la fracción endotelial.

Estos resultados permiten sugerir que las señales que se envían entre sí las células Bmi1+ cuando se encuentran en cultivo, de manera espontánea, son capaces de generar unas estructuras vasculares muy complejas. Estos datos abren la puerta para la profundización en el estudio de las señales autocrinas/paracrinas que están regulando su diferenciación con el fin de poder estimular a las células y tener un control preciso sobre su diferenciación endotelial.

Siempre ha habido una genuina dificultad en obtener una creíble diferenciación de las células progenitoras cardíacas adultas hacia el linaje cardiomiocítico *in vitro*. Una de las maneras definitivas de probar una diferenciación terminal es a través de la presencia de un latido que siga el mismo patrón al de un cardiomiocito maduro. Hasta la fecha han sido contadas las ocasiones en las que se ha reportado una diferenciación con latido de las células progenitoras adultas empleadas en los protocolos de diferenciación cardíaca (Matsuura et al., 2004). Realmente no parece que haya un consenso entre los diferentes investigadores a la hora de definir protocolos reproducibles que promuevan una diferenciación completa de las células progenitoras cardíacas adultas en cardiomiocitos maduros que latan *in vitro*. Las razones por las que esto todavía sucede no han sido dilucidadas. Parece claro que estamos ante una situación totalmente distinta a la perfectamente descrita para las iPS y células embrionarias. La ausencia de una diferenciación completa puede ser debido a condiciones subóptimas de los protocolos de diferenciación, aunque es probable que hayan razones mucho más profundas subyacentes. Es posible que, en parte, estas dificultades técnicas estén relacionadas con la situación fisiológica de un órgano con una tasa de reemplazamiento tan baja o, cabe plantearse el hecho de que la diferenciación se lleva a cabo en cultivos bidimensionales, que no reproducen las condiciones del ambiente *in vivo* de estas células. En este trabajo se han empleado la mayor parte de los protocolos publicados para la diferenciación cardiomiocítica (oxitocina, dexametasona, 5-azacitidina) pero los resultados obtenidos han sido bastante pobres. Sin embargo el sistema con el que se consiguieron los mejores resultados fue con el del co-cultivo con cardiomiocitos neonatales de rata, un sistema ampliamente adoptado (Condorelli et al., 2001; Galvez et al., 2008; Miyamoto et al., 2010; Wang et al., 2006; Zaruba et al., 2010). Aunque no se obtuvo una diferenciación terminal, con latido, la detección de estructuras estriadas positivas para marcadores de cardiomiocito como la α -actinina sarcomérica es ampliamente aceptado como un índice de diferenciación cardiomiocítica.

Las células madre se encuentran generalmente en un estado de quiescencia *in vivo* (Reya et al., 2001) y las interacciones de las células madre con el nicho en el que se encuentran son cruciales para su largo auto-mantenimiento y auto-renovación (Spradling et al., 2001). Una de las técnicas

empleadas que se utiliza para valorar las condiciones generadas en el nicho y que podría mimetizar el ambiente en el que se encuentran las células madre *in vivo*, es la formación de cardiosferas (Li & Bhatia, 2011). Esta metodología ha sido ampliamente adoptada para obtener poblaciones formadas por progenitores cardíacos (Chimenti et al., 2012; Davis et al., 2010; Li et al., 2010; Messina et al., 2004; Smith et al., 2007) que han sido evaluados recientemente en un ensayo clínico (Makkar et al., 2012). Además, la técnica de generar neuroesferas se ha empleado en el campo de las células madre nerviosas como una útil herramienta para evaluar su potencial de auto-mantenimiento (Ferron et al., 2011).

Cuando se compara la capacidad de generar cardiosferas de las poblaciones Bmi1+ y Sca-1+Bmi1-, a pesar de que la segunda población es capaz de generar mayor número de cardiosferas (no significativo), el tamaño de las mismas es significativamente mayor en el caso de la población Bmi1+ (partiendo del mismo número de células inicial y bajo las mismas condiciones de cultivo). Este resultado permite sugerir una mayor capacidad de auto-renovación de las células Bmi1+ respecto a las Sca-1+Bmi1-.

El estudio del transcriptoma de las células Bmi1+ recién aisladas, con el fin de preservar lo más posible sus características, ha revelado que estas células cardíacas conservan factores críticos para el mantenimiento de un estadio embrionario pluripotente, marcado por la expresión de Oct4, Suz12, CD133 y Dppa5 (Kim et al., 2005; Shi & Jin, 2010). No solamente presentan transcritos relevantes para estadios tempranos de la embriogénesis sino también de genes clave para diferentes compartimentos de células madre adultas tales como las hematopoyéticas o las neurales. Estos resultados se apoyaron en el análisis de transcritos relevantes para la regulación de rutas relacionadas con la multipotencia tales como Klf2 y Sox2 (Bourillot & Savatier, 2010; Wang et al., 2012), sugiriendo el mantenimiento de un estadio quiescente y multipotente en el que las células Bmi1+ se encuentran *in vivo* y les permite mantenerse en un estado indiferenciado. Por otro lado, se detectaron factores de transcripción reguladores de rutas involucradas en el desarrollo cardíaco tales como Srf, Myocd y Tbx5 (Horb & Thomsen, 1999; Huang et al., 2012; Parlakian et al., 2004) o la ruta de Notch (High & Epstein, 2008). Curiosamente, y a pesar de que la población Bmi1+ contiene genes relacionados con la pluripotencia celular, también se detectó la expresión de transcritos relacionados con el aparato contráctil de un cardiomiocito maduro tales como troponinas o miosinas pesadas así como de genes implicados en los canales de calcio. Esto permite sugerir que las células Bmi1+ están en un estado pluripotente y quiescente en el órgano pero contienen los transcritos necesarios para una diferenciación hacia linaje cardiomiocítico.

Este resultado coincide con los de otros trabajos recientes, donde se describe la dualidad presentada en esta investigación: poblaciones de células madre indiferenciadas co-expresando marcadores típicos de linajes diferenciados, considerados hasta la fecha, marcadores de diferenciación celular (Buczacki et al., 2013; Montserrat et al., 2013). Estos resultados pueden estar indicando que las

células deben estar preparadas para una diferenciación, ya que las decisiones celulares suceden bajo unas condiciones micro ambientales muy particulares, donde han de ser capaces de responder de una manera muy rápida para diferenciarse según las necesidades.

Del estudio *in vitro* de la población Bmi1+ podemos concluir que las células madre Bmi1+ constituyen una pequeña fracción de la población Sca-1 que expresa altos niveles de genes relacionados con un estado pluripotente a la vez que expresan genes relacionados con el linaje cardíaco; y que esta población tiene capacidad para diferenciarse hacia los linajes más importantes del corazón.

4.- ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS MADRE Bmi1-CSCs *IN VIVO*

La caracterización de las células Bmi1+ se ha llevado a cabo empleando las células con la menor manipulación posible para evitar los posibles artefactos que surgen como consecuencia del cultivo *ex vivo*. La mejor aproximación para comprender la implicación de una determinada población de células madre en el recambio del órgano es a través de estrategias de trazado de linaje. Hasta la fecha son realmente escasos los trabajos en corazón adulto que profundizan en este aspecto. Siguen quedando cuestiones por responder, relacionadas con la definición de la jerarquía de las células madre/progenitoras cardíacas, con el fin de comprender la contribución de cada fracción a los linajes principales del órgano, tanto en condiciones fisiológicas de homeostasis como tras un daño cardíaco (Rasmussen et al., 2011).

A menudo el término de célula madre es empleado de una manera imprecisa, ignorando la estricta definición que éste constituye. Las células madre están claramente definidas por ser células indiferenciadas capaces de auto-mantenerse en el órgano mediante divisiones asimétricas donde una de las células hija mantiene la estirpe mientras que la otra, a través de progresivas rondas de división se compromete y acaba diferenciándose en diferentes tipos celulares especializados. Las células progenitoras no pueden auto-renovarse y su potencial de diferenciación se encuentra más comprometido (Braun & Martire, 2007). En este trabajo se quiso evaluar el potencial de auto-mantenimiento de las células Bmi1+ en el corazón adulto, a lo largo de la vida del animal.

Cinco días después de la inducción con tamoxifeno se pudo detectar una población de células Bmi1+, tanto en animales jóvenes como en animales mayores (1 año) e incluso en animales de 2 años de edad. Estos datos nos indican que las células que expresan Bmi1 se encuentran en el corazón a lo largo de toda la vida del animal. Por otra parte, cuando analizamos la población YFP+ uno o dos años después de la inducción observamos que la población no solo se mantiene, sino que aumenta significativamente, especialmente en animales mayores. Las células YFP+, además, de

mantener el patrón de expresión de los marcadores Sca-1 y CD31, seguían siendo mayoritariamente negativas para c-kit y CD45.

Estos resultados permiten sugerir que parte de las células YFP+ observadas tras dos años de la inducción son células Bmi1+ que se han mantenido en el órgano durante el tiempo de estudio. El aumento de la población en animales mayores, puede sugerir que una parte de estas células pierden sus propiedades de célula madre indiferenciadas (no expresan Bmi1) como parte del programa de envejecimiento, o bien que son progenitores más comprometidos que aún no se han diferenciado. Por otra parte, estos hechos apoyan la idea de que la población de células Bmi1+ no depende o procede de otra población de células más primigenia puesto que si no, se hubiera observado una dilución y pérdida de la marca YFP+ a lo largo de la vida del animal. Las células Bmi1+ se auto-mantienen a lo largo de la vida del animal y por tanto cumplen el criterio de la definición de célula madre. Aunque este método no demuestra formalmente la auto-renovación celular, la excelente correlación encontrada con los experimentos de caza de la marca en animales viejos inducidos tiempo atrás o inducidos cuando ya son mayores, apoya la propuesta de que las células madre cardíacas Bmi1+ son capaces de auto-mantenerse largos periodos de tiempo.

La localización de las células Bmi1+ por inmunohistoquímica muestra que estas células se localizan en agrupaciones (*clusters*), formando estructuras muy compactas que se asemejan a nichos. Estos *clusters* se detectan diseminados en el miocardio, entre las fibras de sarcómeros y algunos de ellos cerca de vasos de gran calibre. Las células YFP+ localizadas en estos nichos expresan CD31, BMI1 y Sca-1 además de estar rodeadas por laminina.

5.- TRAZADO DE LINAJE: Bmi1-CSCs en Homeostasis.

El estudio de trazado de linaje llevado a cabo en este trabajo, bajo la expresión del locus Bmi1, ha identificado una población de células madre cuya progenie es capaz de participar en el recambio del órgano. El estudio se ha enfocado principalmente en el potencial cardiomiogénico de las células Bmi1+ *in vivo*, debido a la controversia acerca de la capacidad de formación de cardiomiocitos por parte de este tipo de poblaciones progenitoras en el corazón adulto. El porcentaje observado de nuevos cardiomiocitos YFP+ durante la homeostasis del órgano, aumenta desde $3\pm 0.2\%$ a los 2 meses de la inducción con tamoxifeno hasta un $7.5\pm 1.3\%$ tras 2 años. Hemos sido capaces de detectar cardiomiocitos YFP+ tanto por citometría de flujo como por inmunohistoquímica e inmunocitoquímica. Cabe mencionar que no se han detectado *clusters* de cardiomiocitos YFP+, y que no se han detectado diferencias aparentes en la frecuencia de cardiomiocitos YFP+ entre ventrículos y aurículas.

Como se ha descrito en el apartado de introducción, Bmi1 es un gen implicado en la identidad de numerosos compartimentos de células madre adultas, controlando su auto-mantenimiento y su estado de pluripotencia, cuya expresión disminuye a medida que las células se diferencian. Por este motivo se ha analizado con especial cuidado la expresión de Bmi1 en la fracción cardiomiocítica del corazón adulto mediante diversas metodologías para descartar falsos positivos, es decir, para descartar que una parte de la fracción cardiomiocítica pudiera expresar Bmi1 y marcarse al inducir con tamoxifeno. Tras cinco días de la inducción no se encontraron cardiomiocitos adultos YFP+, ni analizando por citometría e inmunofluorescencia la fracción cardiomiocítica, ni por el análisis mediante inmunohistoquímica de las secciones fijadas, mientras que sí que se obtuvo la población Bmi1+ mediante la expresión de YFP en la fracción no cardiomiocítica. Por otro lado, y para excluir que los cardiomiocitos YFP+ pudieran tener su origen mayoritariamente en fusiones de células Bmi1+ con cardiomiocitos preexistentes YFP-, se llevó a cabo un análisis de la nucleación de cardiomiocitos YFP+ y YFP-. El estudio reveló la ausencia de diferencias en la nucleación entre ambas poblaciones de cardiomiocitos. No se encontraron diferencias en el porcentaje de cardiomiocitos mononucleares y, tal y como, se ha descrito extensamente en la literatura, el mayor porcentaje de células eran binucleadas (Li et al., 1996; Liu et al., 2010). Estos resultados permiten descartar la generación de los cardiomiocitos YFP+ por un proceso de fusión celular; si suceden, deben de ser eventos extremadamente infrecuentes. ¿Pueden proceder los nuevos cardiomiocitos YFP+ de células Bmi1+ de médula?. En el 2001 Orlic y cols. demostraron que las células madre de la médula ósea (c-kit+CD45+) tenían la capacidad de trans-diferenciarse en cardiomiocitos terminalmente funcionales al ser inyectadas en un modelo de infarto de miocardio (Orlic et al., 2001). Sin embargo, numerosos grupos de investigación intentaron repetir estos experimentos sin resultado positivo (Balsam et al., 2004; Murry et al., 2004). Actualmente, los investigadores están de acuerdo en que la capacidad de trans-diferenciación de las células madre hematopoyéticas, si existe, es muy limitada (Wagers et al., 2002). Las células Bmi1+ carecen de la expresión de CD45 por lo que quedaría esencialmente descartado cualquier evento de trans-diferenciación de las células Bmi1+ procedentes de la médula en cardiomiocitos. Además, la caracterización de su transcriptoma revela que estas células presentan un perfil de marcadores típicamente cardíaco y no hematopoyético, lo que sugeriría que las células han cambiado su perfil de marcadores genéticos adaptándose al patrón cardíaco. Si las células Bmi1+ tienen su origen ontogénico en la médula requiere posterior investigación.

6.- PAPEL DE LAS Bmi1-CSCs EN UNA SITUACIÓN DE DAÑO CARDIACO.

El fallo cardíaco se está convirtiendo en una carga para el sistema de salud público de los países desarrollados, y algunos investigadores predicen que el problema alcanzará proporciones epidémicas a medida que la población envejezca. La muerte de cardiomiocitos que acontece a un

infarto cardíaco subyace al posterior fallo cardíaco. El ventrículo izquierdo humano cuenta con, aproximadamente, 2-4 billones de cardiomiocitos, 25% de los cuales pueden desaparecer tras un proceso de infarto de miocardio en tan solo unas pocas horas (Murry et al., 2006). Si el corazón posee aunque sea una pequeña respuesta regenerativa innata, se podría explotar terapéuticamente para incrementar la función cardíaca. De esta manera, durante los últimos 15 años, los investigadores han creado el campo de la “reparación cardíaca” con el objetivo de abordar el problema de una manera más intervencional. El fin último de este campo emergente es regenerar el miocardio tras un daño con el objetivo de prevenir el fallo cardíaco. Este campo interdisciplinario se nutre de los avances en áreas que integran el conocimiento de las células madre, la biología del desarrollo y los biomateriales en un intento de crear o potenciar la formación de nuevo miocardio. El trazado de linaje se convierte de nuevo en una herramienta imprescindible para evaluar el potencial de una población determinada de células ante un daño cardíaco y su capacidad para generar nuevo miocardio.

El análisis del transcriptoma de las células Bmi1 5 días después de un infarto agudo de miocardio, en ratones adultos, mostró la activación de genes implicados en la proliferación celular, el movimiento y el ciclo celular; es decir, todas aquellas funciones requeridas para permitir a las células proliferar y migrar para alcanzar la zona de daño. También se detectó una disminución de algunos genes de pluripotencia sugiriendo un cambio, posiblemente relacionado con la activación de programas de proliferación/diferenciación que acontecen tras un infarto. Estos resultados pueden verse soportados por el incremento significativo en el número de células YFP+ obtenidas por *sorting* 5 días después del IAM.

El trazado de linaje llevado a cabo con las células Bmi1+ tras un infarto agudo de miocardio reveló que las células que expresan Bmi1 contribuyen en gran medida en la formación de nuevos cardiomiocitos, alcanzando el $18.4 \pm 4.6\%$ del total de cardiomiocitos, un año después del daño cardíaco. Estos resultados proveen la primera identificación directa de la contribución de una población de células madre cardíacas en la reparación del corazón tras un daño. Estos nuevos cardiomiocitos se localizan tanto en el borde de la zona infartada como en el resto del miocardio sano, pero no dentro de la zona isquémica. Este resultado indica que, aunque no son capaces de recuperar la zona dañada, sí pueden participar en la recuperación de la función del miocardio compensando con un aumento del miocardio sano.

Los *clusters* YFP+ localizados en la zona del infarto están presentes 15 días después del daño aunque desaparecen 3 meses después. Este resultado permite sugerir que, aunque las células Bmi1+ sean capaces de soportar inicialmente el ambiente desfavorable generado tras un infarto, 3 meses después han desaparecido de la zona isquémica. Se requiere de una profunda investigación para averiguar si las células van muriendo progresivamente debido a este ambiente desfavorable, migran

a otras zonas del miocardio, o por el contrario, las células Bmi1+ que se localizan en el área del infarto pierden sus propiedades de célula madre y se agotan.

La respuesta observada en las células Bmi1+ adultas ante un infarto de miocardio no la comparten las células Bmi1+ neonatales. Porrello y cols. han descrito que el corazón neonatal de ratón preserva una capacidad de regeneración cuando se realiza la ablación de la sección apical (Porrello et al., 2011), similar a lo observado en el corazón adulto del pez cebra (Poss, 2007). Los autores, mediante experimentos de mapeo genético sugieren que la fuente celular encargada de la regeneración, es la proliferación de cardiomiocitos preexistentes. En el caso del pez cebra, tras una resección apical, esta especie sella efectivamente la herida con una cicatriz formada por fibrina que es gradualmente reemplazada por nuevo tejido cardíaco en vez de por una cicatriz fibrótica que aparece en los mamíferos (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010; Lepilina et al., 2006; Poss et al., 2002). Diferentes publicaciones han demostrado mediante trazado de linaje que la principal fuente celular de los nuevos cardiomiocitos son los propios cardiomiocitos preexistentes, que albergan una elevada capacidad de proliferación (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010). En esta especie, el índice de proliferación de los cardiomiocitos, incluso a nivel basal, en condiciones de homeostasis es muy superior al de los mamíferos (Poss et al., 2002).

Al realizar la misma aproximación con nuestro modelo transgénico, las células Bmi1+ no parecen contribuir en este escenario de regeneración neonatal. La posible explicación por la que las células Bmi1 neonatales y adultas se comportan de manera distinta ante un daño cardíaco podría ser debido a que los modelos de daño empleados son diferentes y, por tanto, las señales generadas distintas. Pero quizás la razón principal tenga que ver con el momento en el que acontece la binucleación de los cardiomiocitos en ratón. Durante los siete primeros días de vida postnatal, los cardiomiocitos mayoritariamente mononucleados pueden proliferar, pero a partir del séptimo día, se produce un proceso de binucleación y salen del ciclo celular. Nuestros datos sugieren que es, en esta transición, cuando podría suceder un cruce de información entre los cardiomiocitos y las células madre, de tal manera, que durante los primeros siete días, los cardiomiocitos se encargan de cubrir las necesidades regenerativas, si acontecieran, mientras que a partir del día 7, las células madre jugarían un papel clave en la limitada regeneración ofrecida por los cardiomiocitos coincidiendo con la binucleación de los mismos y con ello, con su bajo índice de proliferación.

7.- Bmi1-CSCs EN EL CONTESTO ACTUAL DEL CAMPO DE LA REGENERACIÓN CARDÍACA

Cómo se ha mencionado en el apartado de Introducción, existen dos trabajos de mapeo genético con el modelo transgénico MerCreMer/ZEG, desarrollados en el grupo del Dr. Richard Lee, que sugieren que la renovación de cardiomiocitos tras un infarto es debida a la participación de un

compartimento de células madre o progenitores cardíacos (Hsieh et al., 2007; Loffredo et al., 2011). Tras un modelo de daño cardíaco (infarto de miocardio), Hsieh y cols. observaron que la fracción de cardiomiocitos β -gal⁺ aumentaba, indicando una renovación del corazón a cargo de los progenitores cardíacos β -gal⁺. Sin embargo, en condiciones de homeostasis, no fueron capaces de detectar variaciones, con el tiempo, en el porcentaje de cardiomiocitos β -gal⁺, concluyendo que no había una renovación de cardiomiocitos en condiciones fisiológicas. Posteriormente, en el trabajo de Loffredo y cols., los autores demostraron un aumento en la capacidad de renovación de los cardiomiocitos a cargo de una población de células progenitoras cardíacas tras un daño, pero en este caso, activada tras la inyección de células c-kit⁺ de médula ósea.

Sin embargo y, a pesar de que estos trabajos representaron una esperanza para el campo, en ambos casos, no se pudo identificar ni la identidad molecular ni la localización anatómica de estas células progenitoras cardíacas en el corazón adulto de ratón.

Recientemente, también el grupo del Dr. Richard Lee, (Senyo et al. 2013) utilizando el mismo modelo transgénico MerCreMer/ZEG pero empleando técnicas más sofisticadas para evaluar la proliferación celular, como es la incorporación de N¹⁵, sugirió que los cardiomiocitos preexistentes serían los encargados de generar nuevos cardiomiocitos, mediante su proliferación en condiciones fisiológicas del órgano, y que, son los que, también proliferarían mayoritariamente tras un daño isquémico (Senyo et al. 2013). Este trabajo, por tanto, apoyaría un rol principal de la proliferación de cardiomiocitos preexistentes en la biología del corazón adulto de mamíferos.

Las conclusiones tan dispares obtenidas con el mismo modelo transgénico han reabierto el debate de la regeneración mediada por la proliferación de cardiomiocitos preexistentes. En el trabajo de Senyo y cols., al contrario que en los anteriores, los autores son capaces de detectar una renovación de los cardiomiocitos en homeostasis, aunque muy baja, que puede ser debida al incremento de sensibilidad acontecida al emplear metodologías más sensibles. Tras un infarto agudo de miocardio, los autores, al igual que lo descrito en los trabajos de Hsieh y Loffredo, observaron una dilución de los cardiomiocitos GFP⁺, pero en este último trabajo encuentran que el porcentaje de cardiomiocitos marcados con N¹⁵ es el mismo en los cardiomiocitos GFP⁺ y GFP⁻, concluyendo que son los cardiomiocitos los que proliferan mayoritariamente ante un daño .

El modelo MerCreMer/ZEG es un modelo de mapeo genético indirecto. Sin inducir el modelo tiene un escape, (*leakage*) del 0.3±0.1 % de cardiomiocitos GFP⁺ (Hsieh et al. 2007). Por otra parte, tras el pulso de tamoxifeno, la eficacia de marcaje de los cardiomiocitos GFP⁺ es del 82.7±5.5%. Esta incompleta conversión, (de la que se desconoce el motivo), pone en duda la sensibilidad del sistema para detectar un porcentaje tan bajo de cardiomiocitos como el que se estaría recambiando en el corazón en homeostasis. Además, la identificación de las células que están duplicando su

material genético, tiene implícita una dificultad intrínseca para distinguir entre replicación y reparación del ADN, a parte de la dificultad para distinguir entre citoquinesis y proliferación celular. En el trabajo de Senyo y cols., este análisis se lleva a cabo exclusivamente mediante técnicas de inmunohistoquímica en cortes seriados. La identificación inequívoca de los núcleos de los cardiomiocitos y de las células madre del corazón mediante microscopía confocal en cortes seriados, es insuficiente para resolver aquellos eventos nucleares no cardiomiocíticos que estén en estrecho contacto con el citoplasma de los cardiomiocitos. Por otra parte, la descripción llevada a cabo por varios estudios donde se demuestra que el promotor MHC podría estar activo en la fracción indiferenciada de progenitores cardíacos (Bailey et al., 2009; Zelarayan et al., 2008), pone en duda las conclusiones obtenidas en el trabajo de Sanyo y cols., y han sido discutidas en una revisión reciente de Soonpa y cols. (Soonpa et al., 2013).

El trabajo de Senyo y cols. revisita la idea de que los cardiomiocitos adultos retienen la capacidad suficiente de proliferar para llevar a cabo la renovación del órgano. Sin embargo, los cardiomiocitos que proliferan solamente son los mononucleados, cuya proporción en el corazón es baja (Li et al., 1996). Numerosos estudios que aportan datos sobre el porcentaje de cardiomiocitos con capacidad para proliferar sugieren que, en mamíferos, esta tasa es extremadamente baja. Así Soonpa y Field identificaron sólo un cardiomiocito ventricular de ratón llevando a cabo la síntesis de su ADN de 180.000 células analizadas (0.0006%) en el transcurso de 36 horas. También analizaron el porcentaje de cardiomiocitos que replicaban su material genético tras un daño, como la cauterización, encontrando un ligero incremento en el índice de proliferación: 0.00083% (Soonpa & Field, 1997, 1998). Incluso, a pesar de que el cardiomiocito replique su material genético, éste tiene que llevar a cabo la citocinesis, lo cual, reduce aun más si cabe el porcentaje de células proliferando.

Por tanto, aunque los índices de proliferación de los cardiomiocitos adultos parece ser muy baja, sugiere la posibilidad de que este fenómeno pueda ser potenciado terapéuticamente, teniendo en cuenta desde el principio, que el papel que pueda jugar la proliferación de cardiomiocitos preexistentes en el recambio del corazón es muy limitado.

Así pues, la utilidad de los sistemas de trazado de linaje para identificar la fuente de renovación depende en gran medida de la fidelidad de los modelos reporteros empleados.

En pez cebra, datos procedentes de modelos reporteros complejos sugerían una renovación de cardiomiocitos por el compartimento de las células madre. En este caso, utilizando modelos más directos, se demostró la participación de los cardiomiocitos en la renovación y la regeneración cardíaca de pez cebra (Lepilina et al., 2006; Raya et al., 2003). El modelo reportero empleado en esta tesis es un modelo muy sencillo, ampliamente descrito y empleado en el campo, facilitando así

la interpretación de los datos obtenidos. Mientras que el mapeo genético con el modelo MerCreMer/ZEG es un modelo complejo y no totalmente caracterizado.

Recientemente Uchida y cols. han publicado un trabajo de trazado de linaje bajo el gen Sca-1, en el que muestran como una sub-población de la fracción global de las células Sca-1+ contribuyen en el reemplazamiento de los cardiomiocitos en el corazón adulto, aunque parecen tener una escasa relevancia tras un daño cardíaco (Uchida et al., 2013). Los autores sugieren que una pequeña fracción de las células Sca-1+ sería la que retendría la potencialidad para diferenciarse hacia el linaje cardiomiocítico. Usando un modelo directo Sca-1-GFP los autores descartan la presencia de cardiomiocitos maduros Sca-1+. Estos resultados apoyan la ausencia de cardiomiocitos Bmi1+ (teniendo en cuenta que la fracción Bmi1+ está englobada dentro de la población Sca-1) observados en este trabajo. Probablemente la pequeña fracción de células Sca-1+ que reúna las características para contribuir en el mantenimiento del órgano y, por tanto, en el reemplazamiento de los cardiomiocitos, sea la población Bmi1+ descrita en esta tesis. Es bien conocido que el marcador Sca-1 es un marcador heterogéneo mientras que Bmi1 resume las propiedades particulares de las células madre adultas. Sin embargo, a pesar de las metodologías diferentes empleadas en ambos trabajos, la premisas coinciden.

Por otro lado, los autores no detectan la formación de nuevos cardiomiocitos por parte de las células Sca-1+ después de un infarto de miocardio, mientras que las células Bmi1+ tienen un importante implicación tras un daño. Estas diferencias podrían ser explicadas debido a la baja sensibilidad obtenida por un marcador tan heterogéneo como Sca-1 ante una situación de daño donde puede haber una dilución de la marca debida a la entrada de células procedentes de la médula ósea.

Los datos obtenidos en este trabajo y en el de Uchida y cols. sugieren que el corazón tiene una capacidad intrínseca de renovación de cardiomiocitos que recae en una población de células madre.

El estudio de trazado de linaje llevado a cabo con las células Bmi1+ en el corazón adulto de ratón ha permitido obtener evidencia directa del potencial *in vivo* de estas células en la generación de nuevos cardiomiocitos. El incremento observado en el número de nuevos cardiomiocitos generados a lo largo de la vida del organismo resalta el papel de las células madre Bmi1+ en el mantenimiento del órgano bajo condiciones fisiológicas de homeostasis. Los datos presentados en este trabajo sugieren una tasa media de recambio de $7.5 \pm 1.3\%$ de cardiomiocitos nuevos generados a partir de las células Bmi1+ después de 2 años de la inducción. No se puede excluir el papel que puedan tener otras poblaciones progenitoras cardíacas, previamente descritas, en el proceso de auto-mantenimiento del corazón (Beltrami et al., 2003; Chong et al., 2011; Oh et al., 2003; Smart et al., 2011) o una contribución menor de cardiomiocitos proliferantes (Senyo et al., 2013) incluyendo hipotéticos cardiomiocitos Bmi1+ aislados.

CONCLUSIONES

1. La expresión de Bmi1 define una población de células en el corazón adulto de ratón, tanto en animales jóvenes como en animales viejos -de 2 años-. Las células Bmi1 de ratones inducidos a los 2 meses de edad se mantienen a lo largo de toda la vida del animal. Estos resultados demuestran la capacidad de auto-mantenimiento de las células y sugieren su capacidad de auto-renovación.

2. La población Bmi1+ es una sub población de la población Sca-1+ (5.4%) que expresa el marcador Cd31 pero no expresa ni c-kit ni el marcador hematopoyético Cd45, sugiriendo que esta población no proviene de la médula ósea. Este perfil de marcadores se mantiene constante a lo largo de la vida del animal.

3. El análisis del transcriptoma de las células recién aisladas muestra que, estas células Bmi1+ sobre expresan marcadores de células embrionarias y de células multipotentes adultas, cuando se comparan con sus pares Sca1+Bmi1-. También sobre expresan marcadores de diferenciación a linaje cardíaco.

4. En el corazón adulto, las células Bmi1+ se localizan en nichos, agrupaciones donde las células se encuentran rodeadas de laminina, y son positivas para la expresión de Sca-1, Cd31 y Bmi1. Estos nichos YFP+ siguen manteniendo el patrón de expresión de estos marcadores dos meses después de la inducción con tamoxifeno.

5. Las células Bmi1+ muestran multipotencia tanto *in vivo* como *in vitro*. El trazado de linaje permite demostrar la contribución de las células Bmi1+ a los linajes endotelial y cardiomiocítico.

6. Las células Bmi1+ contribuyen a la homeostasis del corazón con la formación de cardiomiocitos totalmente diferenciados, que expresan proteínas típicas de células maduras y con canales de calcio funcionales. El análisis de la nucleación muestra que no hay diferencias entre los cardiomiocitos YFP+ y los YFP- lo que permite descartar que provengan mayoritariamente de fusiones celulares. A los 5 días de la inducción con TM no se han detectado cardiomiocitos YFP+, demostrando que los cardiomiocitos de animales adultos no expresan Bmi1.

7. El número de cardiomiocitos YFP+ aumenta a lo largo de la vida del animal. Estos cardiomiocitos YFP+ se localizan en las paredes, tanto de las aurículas como de los ventrículos.

8. Las células Bmi1+ responden ante un daño agudo, cambiando su transcriptoma, activando genes relacionados con proliferación, movimiento y ciclo celular y disminuyendo la expresión de marcadores de pluripotencia. Estos cambios se relacionan posiblemente, con la activación de programas de proliferación/diferenciación.

9. Las células madre Bmi1⁺ responden ante un daño agudo, con la formación de nuevos cardiomiocitos ($18.4 \pm 4.6\%$ un año después del daño). Estos nuevos cardiomiocitos se localizan tanto en el borde de la zona infartada como en el resto del miocardio sano, pero no dentro de la zona isquémica.

10. Las células Bmi1⁺ no parecen tener un papel en la regeneración tras un daño severo en neonatos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler, C.P., & Friedburg, H. (1986). Myocardial DNA content, ploidy level and cell number in geriatric hearts: post-mortem examinations of human myocardium in old age. *Journal of molecular and cellular cardiology* 18, 39-53.
- Alexander, C.M., & Werb, Z. (1989). Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr Opin Cell Biol* 1, 974-982.
- Aloia, L., Di Stefano, B., & Di Croce, L. (2013). Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. *Development* 140, 2525-2534.
- Anversa, P., Kajstura, J., Leri, A., & Bolli, R. (2006). Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 113, 1451-1463.
- Arminan, A., Gandia, C., Bartual, M., Garcia-Verdugo, J.M., Lledo, E., Mirabet, V., Llop, M., Barea, J., Montero, J.A., & Sepulveda, P. (2009). Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 18, 907-918.
- Astorri, E., Bolognesi, R., Colla, B., Chizzola, A., & Visioli, O. (1977). Left ventricular hypertrophy: a cytometric study on 42 human hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology* 9, 763-775.
- Badorff, C., Brandes, R.P., Popp, R., Rupp, S., Urbich, C., Aicher, A., Fleming, I., Busse, R., Zeiher, A.M., & Dimmeler, S. (2003). Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 107, 1024-1032.
- Bailey, B., Izarra, A., Alvarez, R., Fischer, K.M., Cottage, C.T., Quijada, P., Diez-Juan, A., & Sussman, M.A. (2009). Cardiac stem cell genetic engineering using the alphaMHC promoter. *Regen Med* 4, 823-833.
- Balsam, L.B., Wagers, A.J., Christensen, J.L., Kofidis, T., Weissman, I.L., & Robbins, R.C. (2004). Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428, 668-673.
- Banerjee, I., Fuseler, J.W., Price, R.L., Borg, T.K., & Baudino, T.A. (2007). Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H1883-1891.
- Bantignies, F., Roure, V., Comet, I., Leblanc, B., Schuettengruber, B., Bonnet, J., Tixier, V., Mas, A., & Cavalli, G. (2011). Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in *Drosophila*. *Cell* 144, 214-226.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., *et al.* (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003-1007.
- Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., De Angelis, A., Yasuzawa-Amano, S., Trofimova, I., Siggins, R.W., Lécapitaine, N., *et al.* (2007). Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14068-14073.

Beltrami, A.P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S.M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C.A., *et al.* (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344, 1750-1757.

Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., *et al.* (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-776.

Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., *et al.* (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324, 98-102.

Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.

Bersell, K., Arab, S., Haring, B., & Kuhn, B. (2009). Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell* 138, 257-270.

Biehs, B., Hu, J.K., Strauli, N.B., Sangiorgi, E., Jung, H., Heber, R.P., Ho, S., Goodwin, A.F., Dasen, J.S., Capecchi, M.R., *et al.* (2013). BMI1 represses Ink4a/Arf and Hox genes to regulate stem cells in the rodent incisor. *Nat Cell Biol* 15, 846-852.

Blanpain, C., & Fuchs, E. (2006). Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 339-373.

Borg, T.K., Rubin, K., Carver, W., Samarel, A., & Terracio, L. (1996). The cell biology of the cardiac interstitium. *Trends Cardiovasc Med* 6, 65-70.

Bourillot, P.Y., & Savatier, P. (2010). Kruppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biol* 8, 125.

Bowers, S.L., Banerjee, I., & Baudino, T.A. (2010). The extracellular matrix: at the center of it all. *Journal of molecular and cellular cardiology* 48, 474-482.

Braun, T., & Martire, A. (2007). Cardiac stem cells: paradigm shift or broken promise? A view from developmental biology. *Trends Biotechnol* 25, 441-447.

Braun, T., & Dimmeler, S. (2009). Breaking the silence: stimulating proliferation of adult cardiomyocytes. *Dev Cell* 17, 151-153.

Brodsky, W.Y., Arefyeva, A.M., & Uryvaeva, I.V. (1980). Mitotic polyploidization of mouse heart myocytes during the first postnatal week. *Cell Tissue Res* 210, 133-144.

Bruggeman, S.W., Valk-Lingbeek, M.E., van der Stoop, P.P., Jacobs, J.J., Kieboom, K., Tanger, E., Hulsman, D., Leung, C., Arsenijevic, Y., Marino, S., *et al.* (2005). Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes Dev* 19, 1438-1443.

Bruggeman, S.W., Hulsman, D., & van Lohuizen, M. (2009). Bmi1 deficient neural stem cells have increased integrin dependent adhesion to self-secreted matrix. *Biochim Biophys Acta* 1790, 351-360.

Bu, L., Jiang, X., Martin-Puig, S., Caron, L., Zhu, S., Shao, Y., Roberts, D.J., Huang, P.L., Domian, I.J., & Chien, K.R. (2009). Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature* 460, 113-117.

Buczacki, S.J., Zecchini, H.I., Nicholson, A.M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., & Winton, D.J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* 495, 65-69.

Cao, R., & Zhang, Y. (2004a). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 14, 155-164.

Cao, R., & Zhang, Y. (2004b). SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 15, 57-67.

Cao, R., Tsukada, Y., & Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* 20, 845-854.

Carvalho, A.B., & de Carvalho, A.C. (2010). Heart regeneration: Past, present and future. *World J Cardiol* 2, 107-111.

Challen, G.A., & Little, M.H. (2006). A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 24, 3-12.

Chamberlain, S.J., Yee, D., & Magnuson, T. (2008). Polycomb repressive complex 2 is dispensable for maintenance of embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cells* 26, 1496-1505.

Chang, M.G., Tung, L., Sekar, R.B., Chang, C.Y., Cysyk, J., Dong, P., Marban, E., & Abraham, M.R. (2006). Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an in vitro coculture model. *Circulation* 113, 1832-1841.

Chen, X., Wilson, R.M., Kubo, H., Berretta, R.M., Harris, D.M., Zhang, X., Jaleel, N., MacDonnell, S.M., Bearzi, C., Tillmanns, J., *et al.* (2007). Adolescent feline heart contains a population of small, proliferative ventricular myocytes with immature physiological properties. *Circ Res* 100, 536-544.

Chimenti, I., Gaetani, R., Barile, L., Forte, E., Ionta, V., Angelini, F., Frati, G., Messina, E., & Giacomello, A. (2012). Isolation and expansion of adult cardiac stem/progenitor cells in the form of cardiospheres from human cardiac biopsies and murine hearts. *Methods Mol Biol* 879, 327-338.

Chong, J.J., Chandrakanthan, V., Xaymardan, M., Asli, N.S., Li, J., Ahmed, I., Heffernan, C., Menon, M.K., Scarlett, C.J., Rashidianfar, A., *et al.* (2011). Adult cardiac-resident MSC-like stem cells with a proepicardial origin. *Cell stem cell* 9, 527-540.

Clubb, F.J., Jr., & Bishop, S.P. (1984). Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Lab Invest* 50, 571-577.

Condorelli, G., Borello, U., De Angelis, L., Latronico, M., Sirabella, D., Coletta, M., Galli, R., Balconi, G., Follenzi, A., Frati, G., *et al.* (2001). Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10733-10738.

Cui, K., Zang, C., Roh, T.Y., Schones, D.E., Childs, R.W., Peng, W., & Zhao, K. (2009). Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell stem cell* 4, 80-93.

Davis, D.R., Ruckdeschel Smith, R., & Marban, E. (2010). Human cardiospheres are a source of stem cells with cardiomyogenic potential. *Stem Cells* 28, 903-904.

Ellison, G.M., Galuppo, V., Vicinanza, C., Aquila, I., Waring, C.D., Leone, A., Indolfi, C., & Torella, D. (2010). Cardiac stem and progenitor cell identification: different markers for the same cell? *Front Biosci (Schol Ed)* 2, 641-652.

Endoh, M., Endo, T.A., Endoh, T., Fujimura, Y., Ohara, O., Toyoda, T., Otte, A.P., Okano, M., Brockdorff, N., Vidal, M., *et al.* (2008). Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development* 135, 1513-1524.

Engel, F.B., Hsieh, P.C., Lee, R.T., & Keating, M.T. (2006). FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15546-15551.

Fasano, C.A., Phoenix, T.N., Kokovay, E., Lowry, N., Elkabetz, Y., Dimos, J.T., Lemischka, I.R., Studer, L., & Temple, S. (2009). Bmi-1 cooperates with Foxg1 to maintain neural stem cell self-renewal in the forebrain. *Genes Dev* 23, 561-574.

Ferron, S.R., Charalambous, M., Radford, E., McEwen, K., Wildner, H., Hind, E., Morante-Redolat, J.M., Laborda, J., Guillemot, F., Bauer, S.R., *et al.* (2011). Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis. *Nature* 475, 381-385.

Francis, N.J., Kingston, R.E., & Woodcock, C.L. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* 306, 1574-1577.

Fransioli, J., Bailey, B., Gude, N.A., Cottage, C.T., Muraski, J.A., Emmanuel, G., Wu, W., Alvarez, R., Rubio, M., Ottolenghi, S., *et al.* (2008). Evolution of the c-kit-positive cell response to pathological challenge in the myocardium. *Stem Cells* 26, 1315-1324.

Galvez, B.G., Sampaolesi, M., Barbuti, A., Crespi, A., Covarello, D., Brunelli, S., Dellavalle, A., Crippa, S., Balconi, G., Cuccovillo, I., *et al.* (2008). Cardiac mesoangioblasts are committed, self-renewable progenitors, associated with small vessels of juvenile mouse ventricle. *Cell Death Differ* 15, 1417-1428.

- Gaudesius, G., Miragoli, M., Thomas, S.P., & Rohr, S. (2003). Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res* 93, 421-428.
- Gregorio, C.C., & Antin, P.B. (2000). To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol* 10, 355-362.
- Hansson, E.M., Lindsay, M.E., & Chien, K.R. (2009). Regeneration next: toward heart stem cell therapeutics. *Cell stem cell* 5, 364-377.
- Haupt, Y., Alexander, W.S., Barri, G., Klinken, S.P., & Adams, J.M. (1991). Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell* 65, 753-763.
- Hemenway, C.S., Halligan, B.W., & Levy, L.S. (1998). The Bmi-1 oncoprotein interacts with dinG and MPh2: the role of RING finger domains. *Oncogene* 16, 2541-2547.
- High, F.A., & Epstein, J.A. (2008). The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat Rev Genet* 9, 49-61.
- Horb, M.E., & Thomsen, G.H. (1999). Tbx5 is essential for heart development. *Development* 126, 1739-1751.
- Hsieh, P.C., Segers, V.F., Davis, M.E., MacGillivray, C., Gannon, J., Molkentin, J.D., Robbins, J., & Lee, R.T. (2007). Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* 13, 970-974.
- Hu, H., & Sachs, F. (1997). Stretch-activated ion channels in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29, 1511-1523.
- Huang, J., Elicker, J., Bowens, N., Liu, X., Cheng, L., Cappola, T.P., Zhu, X., & Parmacek, M.S. (2012). Myocardin regulates BMP10 expression and is required for heart development. *J Clin Invest* 122, 3678-3691.
- Itahana, K., Zou, Y., Itahana, Y., Martinez, J.L., Beausejour, C., Jacobs, J.J., Van Lohuizen, M., Band, V., Campisi, J., & Dimri, G.P. (2003). Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* 23, 389-401.
- Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A., & van Lohuizen, M. (1999a). The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 397, 164-168.
- Jacobs, J.J., Scheijen, B., Voncken, J.W., Kieboom, K., Berns, A., & van Lohuizen, M. (1999b). Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* 13, 2678-2690.
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 *Suppl*, 245-254.

- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Marti, M., Raya, A., & Izpisua Belmonte, J.C. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 464, 606-609.
- Kajstura, J., Leri, A., Finato, N., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., & Anversa, P. (1998). Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8801-8805.
- Kajstura, J., Urbanek, K., Perl, S., Hosoda, T., Zheng, H., Ogorek, B., Ferreira-Martins, J., Goichberg, P., Rondon-Clavo, C., Sanada, F., *et al.* (2010). Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circ Res* 107, 305-315.
- Karsner, H.T., Saphir, O., & Todd, T.W. (1925). The State of the Cardiac Muscle in Hypertrophy and Atrophy. *Am J Pathol* 1, 351-372 351.
- Kaustov, L., Ouyang, H., Amaya, M., Lemak, A., Nady, N., Duan, S., Wasney, G.A., Li, Z., Vedadi, M., Schapira, M., *et al.* (2011). Recognition and specificity determinants of the human cbx chromodomains. *J Biol Chem* 286, 521-529.
- Kikuchi, K., Holdway, J.E., Werdich, A.A., Anderson, R.M., Fang, Y., Egnaczyk, G.F., Evans, T., Macrae, C.A., Stainier, D.Y., & Poss, K.D. (2010). Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature* 464, 601-605.
- Kim, S.K., Suh, M.R., Yoon, H.S., Lee, J.B., Oh, S.K., Moon, S.Y., Moon, S.H., Lee, J.Y., Hwang, J.H., Cho, W.J., *et al.* (2005). Identification of developmental pluripotency associated 5 expression in human pluripotent stem cells. *Stem Cells* 23, 458-462.
- Kohl, P., Kamkin, A.G., Kiseleva, I.S., & Streubel, T. (1992). Mechanosensitive cells in the atrium of frog heart. *Exp Physiol* 77, 213-216.
- Koninckx, R., Hensen, K., Daniels, A., Moreels, M., Lambrechts, I., Jongen, H., Clijsters, C., Mees, U., Steels, P., Hendriks, M., *et al.* (2009). Human bone marrow stem cells co-cultured with neonatal rat cardiomyocytes display limited cardiomyogenic plasticity. *Cytherapy* 11, 778-792.
- Korbling, M., Estrov, Z., & Champlin, R. (2003). Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplant* 32 Suppl 1, S23-24.
- Koyanagi, M., Brandes, R.P., Haendeler, J., Zeiher, A.M., & Dimmeler, S. (2005). Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res* 96, 1039-1041.
- Kubo, H., Jaleel, N., Kumarapeli, A., Berretta, R.M., Bratinov, G., Shan, X., Wang, H., Houser, S.R., & Margulies, K.B. (2008). Increased cardiac myocyte progenitors in failing human hearts. *Circulation* 118, 649-657.
- Kuhn, B., del Monte, F., Hajjar, R.J., Chang, Y.S., Lebeche, D., Arab, S., & Keating, M.T. (2007). Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med* 13, 962-969.
- Laflamme, M.A., & Murry, C.E. (2011). Heart regeneration. *Nature* 473, 326-335.

Lagostena, L., Avitabile, D., De Falco, E., Orlandi, A., Grassi, F., Iachininoto, M.G., Ragone, G., Fucile, S., Pompilio, G., Eusebi, F., *et al.* (2005). Electrophysiological properties of mouse bone marrow c-kit⁺ cells co-cultured onto neonatal cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 66, 482-492.

LeGrice, I.J., Smaill, B.H., Chai, L.Z., Edgar, S.G., Gavin, J.B., & Hunter, P.J. (1995). Laminar structure of the heart: ventricular myocyte arrangement and connective tissue architecture in the dog. *Am J Physiol* 269, H571-582.

Lepilina, A., Coon, A.N., Kikuchi, K., Holdway, J.E., Roberts, R.W., Burns, C.G., & Poss, K.D. (2006). A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 127, 607-619.

Lessard, J., & Sauvageau, G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423, 255-260.

Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.

Li, F., Wang, X., Capasso, J.M., & Gerdes, A.M. (1996). Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *Journal of molecular and cellular cardiology* 28, 1737-1746.

Li, L., & Bhatia, R. (2011). Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res* 17, 4936-4941.

Li, T.S., Cheng, K., Lee, S.T., Matsushita, S., Davis, D., Malliaras, K., Zhang, Y., Matsushita, N., Smith, R.R., & Marban, E. (2010). Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem Cells* 28, 2088-2098.

Li, Y.S., Haga, J.H., & Chien, S. (2005). Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech* 38, 1949-1971.

Linke, A., Muller, P., Nurzynska, D., Casarsa, C., Torella, D., Nascimbene, A., Castaldo, C., Cascapera, S., Bohm, M., Quaini, F., *et al.* (2005). Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8966-8971.

Linzbach, A.J. (1960). Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am J Cardiol* 5, 370-382.

Liu, Z., Yue, S., Chen, X., Kubin, T., & Braun, T. (2010). Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by CyclinG1. *Circ Res* 106, 1498-1506.

Loffredo, F.S., Steinhauser, M.L., Gannon, J., & Lee, R.T. (2011). Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell stem cell* 8, 389-398.

Lukacs, R.U., Memarzadeh, S., Wu, H., & Witte, O.N. (2010). Bmi-1 is a crucial regulator of prostate stem cell self-renewal and malignant transformation. *Cell stem cell* 7, 682-693.

Macmahon, H.E. (1937). Hyperplasia and Regeneration of the Myocardium in Infants and in Children. *Am J Pathol* 13, 845-854 845.

Makkar, R.R., Smith, R.R., Cheng, K., Malliaras, K., Thomson, L.E., Berman, D., Czer, L.S., Marban, L., Mendizabal, A., Johnston, P.V., *et al.* (2012). Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 379, 895-904.

Malliaras, K., Zhang, Y., Seinfeld, J., Galang, G., Tseliou, E., Cheng, K., Sun, B., Aminzadeh, M., & Marban, E. (2013). Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO Mol Med* 5, 191-209.

Margueron, R., & Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343-349.

Marston, S.B., & Redwood, C.S. (2003). Modulation of thin filament activation by breakdown or isoform switching of thin filament proteins: physiological and pathological implications. *Circ Res* 93, 1170-1178.

Martin, C.M., Meeson, A.P., Robertson, S.M., Hawke, T.J., Richardson, J.A., Bates, S., Goetsch, S.C., Gallardo, T.D., & Garry, D.J. (2004). Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 265, 262-275.

Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T., *et al.* (2004). Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 279, 11384-11391.

Mercola, M., Ruiz-Lozano, P., & Schneider, M.D. (2011). Cardiac muscle regeneration: lessons from development. *Genes Dev* 25, 299-309.

Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, M.V., Coletta, M., *et al.* (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 95, 911-921.

Miyamoto, S., Kawaguchi, N., Ellison, G.M., Matsuoka, R., Shin'oka, T., & Kurosawa, H. (2010). Characterization of long-term cultured c-kit⁺ cardiac stem cells derived from adult rat hearts. *Stem Cells Dev* 19, 105-116.

Molofsky, A.V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.K., Clarke, M.F., & Morrison, S.J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425, 962-967.

Montserrat, N., Nivet, E., Sancho-Martinez, I., Hishida, T., Kumar, S., Miquel, L., Cortina, C., Hishida, Y., Xia, Y., Esteban, C.R., *et al.* (2013). Reprogramming of human fibroblasts to pluripotency with lineage specifiers. *Cell stem cell* 13, 341-350.

- Morey, L., & Helin, K. (2010). Polycomb group protein-mediated repression of transcription. *Trends Biochem Sci* 35, 323-332.
- Morey, L., Pascual, G., Cozzuto, L., Roma, G., Wutz, A., Benitah, S.A., & Di Croce, L. (2012). Nonoverlapping functions of the Polycomb group Cbx family of proteins in embryonic stem cells. *Cell stem cell* 10, 47-62.
- Murry, C.E., Soonpaa, M.H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H.O., Rubart, M., Pasumarthi, K.B., Virag, J.I., Bartelmez, S.H., Poppa, V., *et al.* (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664-668.
- Murry, C.E., Reinecke, H., & Pabon, L.M. (2006). Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol* 47, 1777-1785.
- Oguro, H., Yuan, J., Ichikawa, H., Ikawa, T., Yamazaki, S., Kawamoto, H., Nakauchi, H., & Iwama, A. (2010). Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. *Cell stem cell* 6, 279-286.
- Oh, H., Bradfute, S.B., Gallardo, T.D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L.H., Behringer, R.R., Garry, D.J., *et al.* (2003). Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12313-12318.
- Orlandi, A., Pagani, F., Avitabile, D., Bonanno, G., Scambia, G., Vigna, E., Grassi, F., Eusebi, F., Fucile, S., Pesce, M., *et al.* (2008). Functional properties of cells obtained from human cord blood CD34+ stem cells and mouse cardiac myocytes in coculture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H1541-1549.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., *et al.* (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705.
- Papp, B., & Muller, J. (2006). Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins. *Genes Dev* 20, 2041-2054.
- Park, I.K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M.W., Pihalja, M., Weissman, I.L., Morrison, S.J., & Clarke, M.F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 302-305.
- Parlakian, A., Tuil, D., Hamard, G., Tavernier, G., Hentzen, D., Concordet, J.P., Paulin, D., Li, Z., & Daegelen, D. (2004). Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 24, 5281-5289.
- Pasini, D., Bracken, A.P., Jensen, M.R., Lazzerini Denchi, E., & Helin, K. (2004). Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J* 23, 4061-4071.

- Peng, J.C., Valouev, A., Swigut, T., Zhang, J., Zhao, Y., Sidow, A., & Wysocka, J. (2009). Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell* 139, 1290-1302.
- Pietersen, A.M., Evers, B., Prasad, A.A., Tanger, E., Cornelissen-Steijger, P., Jonkers, J., & van Lohuizen, M. (2008). Bmi1 regulates stem cells and proliferation and differentiation of committed cells in mammary epithelium. *Curr Biol* 18, 1094-1099.
- Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., & Sadek, H.A. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331, 1078-1080.
- Poss, K.D., Wilson, L.G., & Keating, M.T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298, 2188-2190.
- Poss, K.D. (2007). Getting to the heart of regeneration in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol* 18, 36-45.
- Potten, C.S., & Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001-1020.
- Rasmussen, T.L., Raveendran, G., Zhang, J., & Garry, D.J. (2011). Getting to the heart of myocardial stem cells and cell therapy. *Circulation* 123, 1771-1779.
- Raya, A., Koth, C.M., Buscher, D., Kawakami, Y., Itoh, T., Raya, R.M., Sternik, G., Tsai, H.J., Rodriguez-Esteban, C., & Izpisua-Belmonte, J.C. (2003). Activation of Notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1, 11889-11895.
- Reed, R.K., Rubin, K., Wiig, H., & Rodt, S.A. (1992). Blockade of beta 1-integrins in skin causes edema through lowering of interstitial fluid pressure. *Circ Res* 71, 978-983.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., & Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Robledo, M. (1956). Myocardial regeneration in young rats. *Am J Pathol* 32, 1215-1239.
- Sangiorgi, E., & Capecchi, M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* 40, 915-920.
- Sangiorgi, E., & Capecchi, M.R. (2009). Bmi1 lineage tracing identifies a self-renewing pancreatic acinar cell subpopulation capable of maintaining pancreatic organ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7101-7106.
- Sasaki, R., Morishita, T., & Yamagata, S. (1968). Mitosis of heart muscle cells in normal rats. *Tohoku J Exp Med* 96, 405-411.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., *et al.* (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262-265.

Sedmera, D., & Thompson, R.P. (2011). Myocyte proliferation in the developing heart. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 240, 1322-1334.

Senyo, S.E., Steinhauser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T.D., Guerquin-Kern, J.L., Lechene, C.P., & Lee, R.T. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493, 433-436.

Sharpless, N.E., & DePinho, R.A. (1999). The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 9, 22-30.

Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y.J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., Yuan, G.C., & Orkin, S.H. (2008). EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell* 32, 491-502.

Sherr, C.J. (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 731-737.

Shi, G., & Jin, Y. (2010). Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Res Ther* 1, 39.

Smart, N., Bollini, S., Dube, K.N., Vieira, J.M., Zhou, B., Davidson, S., Yellon, D., Riegler, J., Price, A.N., Lythgoe, M.F., *et al.* (2011). De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 474, 640-644.

Smith, R.R., Barile, L., Cho, H.C., Leppo, M.K., Hare, J.M., Messina, E., Giacomello, A., Abraham, M.R., & Marban, E. (2007). Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 115, 896-908.

Soonpaa, M.H., Kim, K.K., Pajak, L., Franklin, M., & Field, L.J. (1996). Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol* 271, H2183-2189.

Soonpaa, M.H., & Field, L.J. (1997). Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Am J Physiol* 272, H220-226.

Soonpaa, M.H., & Field, L.J. (1998). Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 83, 15-26.

Soonpaa, M.H., Rubart, M., & Field, L.J. (2013). Challenges measuring cardiomyocyte renewal. *Biochim Biophys Acta* 1833, 799-803.

Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., & Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98-104.

Tallini, Y.N., Greene, K.S., Craven, M., Spealman, A., Breitbach, M., Smith, J., Fisher, P.J., Steffey, M., Hesse, M., Doran, R.M., *et al.* (2009). c-kit expression identifies cardiovascular precursors in the neonatal heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1808-1813.

Tanaka, T., Komai, Y., Tokuyama, Y., Yanai, H., Ohe, S., Okazaki, K., & Ueno, H. (2013). Identification of stem cells that maintain and regenerate lingual keratinized epithelial cells. *Nat Cell Biol* 15, 511-518.

Tang, X.L., Rokosh, G., Sanganalath, S.K., Yuan, F., Sato, H., Mu, J., Dai, S., Li, C., Chen, N., Peng, Y., *et al.* (2010). Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation* 121, 293-305.

Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D., & de Sauvage, F.J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478, 255-259.

Toraason, M., & Breitenstein, M. (1988). Prenatal ethylene glycol monomethyl ether (EGME) exposure produces electrocardiographic changes in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 95, 321-327.

Tremble, P., Damsky, C.H., & Werb, Z. (1995). Components of the nuclear signaling cascade that regulate collagenase gene expression in response to integrin-derived signals. *J Cell Biol* 129, 1707-1720.

Uchida, S., De Gaspari, P., Kostin, S., Jenniches, K., Kilic, A., Izumiya, Y., Shiojima, I., Grosse Kreymborg, K., Renz, H., Walsh, K., *et al.* (2013). Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Reports* 1, 397-410.

Urbich, C., & Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95, 343-353.

van der Lugt, N.M., Alkema, M., Berns, A., & Deschamps, J. (1996). The Polycomb-group homolog Bmi-1 is a regulator of murine Hox gene expression. *Mech Dev* 58, 153-164.

van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., van der Gulden, H., & Berns, A. (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 737-752.

van Lohuizen, M. (1998). Functional analysis of mouse Polycomb group genes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 54, 71-79.

Wagers, A.J., Sherwood, R.I., Christensen, J.L., & Weissman, I.L. (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297, 2256-2259.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., & Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873-878.

Wang, X., Hu, Q., Nakamura, Y., Lee, J., Zhang, G., From, A.H., & Zhang, J. (2006). The role of the sca-1⁺/CD31⁻ cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells* 24, 1779-1788.

Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S., & Ivanova, N. (2012). Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, & SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell stem cell* 10, 440-454.

Weber, K.T. (1995). Stroma & the search for common ground. Plumbism or promiscuity? *Cardiovasc Res* 29, 330-335.

Yan, K.S., Chia, L.A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J.Y., Su, N., Luo, Y., Heilshorn, S.C., Amieva, M.R., *et al.* (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 & Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 466-471.

Zacharek, S.J., Fillmore, C.M., Lau, A.N., Gludish, D.W., Chou, A., Ho, J.W., Zamponi, R., Gazit, R., Bock, C., Jager, N., *et al.* (2011). Lung stem cell self-renewal relies on BMI1-dependent control of expression at imprinted loci. *Cell stem cell* 9, 272-281.

Zak, R. (1974). Development & proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ Res* 35, suppl II:17-26.

Zaruba, M.M., Soonpaa, M., Reuter, S., & Field, L.J. (2010). Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal & adult mouse hearts. *Circulation* 121, 1992-2000.

Zelarayan, L.C., Noack, C., Sekkali, B., Kmecova, J., Gehrke, C., Renger, A., Zafiriou, M.P., van der Nagel, R., Dietz, R., de Windt, L.J., *et al.* (2008). Beta-Catenin downregulation attenuates ischemic cardiac remodeling through enhanced resident precursor cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19762-19767.

Zhang, Y., Li, T.S., Lee, S.T., Wawrowsky, K.A., Cheng, K., Galang, G., Malliaras, K., Abraham, M.R., Wang, C., & Marban, E. (2010). Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes. *PLoS One* 5, e12559.